INTERFERONBILDUNG, INTERLEUKIN 2-PRODUKTION UND PROLIFERATION IN LYMPHOZYTENKULTUREN VON GESUNDEN UND VON TUMORPATIENTEN

vorgelegt von
Kristin Frowein
aus Hamburg

1986

Disbui. Erlangen
1986

INTERFERONBILDUNG, INTERLEUKIN 2-PRODUKTION UND PROLIFERATION IN LYMPHOZYTENKULTUREN VON GESUNDEN UND VON TUMORPATIENTEN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Kristin Frowein
aus Hamburg

1986

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung	: 21. 10. 1986
Vorsitzender der Promotionskommission	: Prof. Dr. G. Nollau
Erstberichterstatter	: Prof. Dr. H. Kersten
Zweitberichterstatter	: Prof. Dr. J.R. Kalden

Für meine Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538114_0011

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische Immunologie und Rheumatologie der Universität Erlangen-Nürnberg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J.R. Kalden in der Zeit von November 1982 bis Januar 1986 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J.R. Kalden danke ich für die Anregungen zur vorliegenden Arbeit, die stets freundliche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung,

Herrn Prof. Dr. H. Kirchner (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) für sein wissenschaftliches Interesse und die ständige wertvolle Diskussion.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Immunologie in Erlangen und des Instituts für Virusforschung am DKFZ in Heidelberg für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft und angenehme Zusammenarbeit, vor allem Frau R. Augustin, Heidelberg, für ihre Hilfe bei den Interferonbestimmungen.

Diese Arbeit wurde von der Wilhelm Sander-Stiftung gefördert.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

1. 15. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Oktober 1983, Berlin
   Doldi, K., Kalden, J.R. und Kirchner, H. (1983)
   Comparison of cell proliferation and interferon (IFN) production in a whole blood assay and a lymphocyte transformation test (LTT).
   Immunobiology 165, 253

2. 14. Leukozytenkulturkonferenz, März 1984, Hamburg
   Doldi, K., Kalden, J.R. und Kirchner, H.
   Cell proliferation and interferon (IFN) production in response to anti-human T cell antibodies in a whole blood assay and a lymphocyte transformation test (Poster).

3. Doldi, K., Leroux, M., Augustin, R., Kirchner, H. und Kalden, J.R. (1985)
   Proliferation and interferon production in whole blood samples and isolated lymphocyte preparations.
   J. Interferon Res. 5, 55.

4. 2. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Immunologie, März 1986, Erlangen
   Doldi, K., Gramatzki, M., Augustin, R., Glöckl, U., Kirchner, H. und Kalden, J.R.
   Interferon production in patients with malignant tumors and in subpopulations of normal blood and bone marrow cells (Vortrag).

Abkürzungen

ABS	AB-Serum
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMML	Akute Myelomonozytäre Leukämie
BRBC	Rindererythrozyten (bovine red blood cells)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Celsius
c-ALL	common acute lymphoblastic leukemia
Ci	Curie
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
ConA	Concanavalin A
CPE	Zytopathischer Effekt (cytopathic effect)
CSF	Colony stimulating factor
CTC	kultivierte T-Zellen (cultured T cells)
D	Dalton
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
Fab	Ag-bindende Region innerhalb eines Ig (antigen binding fragment)
Fc	C-terminales Fragment der schweren Kette eines Ig (crystallizable fragment)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
Gy	Grey
h	Stunde
^{3}H-TdR	Tritium-Thymidin
HBSS	Hanks'Lösung (Hanks' balanced salt solution)
HLA	System menschlicher Histokompatibilitätsantigene (human leucocyte antigen)
IE	Internationale Einheit

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
KM	Knochenmark
LTT	Lymphozytentransformationstest
M	Molar
$MxAB^+$	Medium 199,x%ig an ABS
MAS	Protein aus Mycoplasma arthritidis Kulturen (mycoplasma arthritidis supernatant)
MHC	Gencluster, das die Histokompatibilitätsantigene kodiert (major histocompatibility complex)
min.	Minute
MLC	Gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture)
MG	Molekulargewicht
n.d.	nicht bestimmt (not determined)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PB	peripheres Blut
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBT	periphere T-Zellen
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
RNA	Ribonukleinsäure
RO^+	RPMI-1640, angereichert mit L-Glutamin, Hepes, $NaHCO_3$,Pen-Strep
$RxAB^+$	Ro^+, x%ig an ABS
RxF^+	Ro^+, x%ig an FCS
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SPA	Protein A von Staphylococcus aureus
SRBC	Schafserythrozyten (sheep red blood cells)
TPA	12-O-Tetradekanylphorbol-13-acetat
Upm	Umdrehung pro Minute
VBT	Vollbluttest
$\bar{x}$	Mittelwert

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Das Interferonsystem	1
1.1.1.	Klassifizierung und Charakterisierung der humanen Interferone	1
1.1.2.	Eigenschaften der Interferone	3
1.1.2.1.	Antiviraler Mechanismus	3
1.1.2.2.	Immunregulatorische Wirkung	3
1.1.2.3.	Anti-Tumor-Wirkung	4
1.1.3.	Interferon-produzierende Zellen	5
1.1.4.	Interferon-Induktoren	6
1.1.5.	Regulation und Kontrolle des Interferon-Systems	9
1.1.5.1.	Genetische Kontrolle der Interferonproduktion	9
1.1.5.2.	„Priming", „Blocking", „Hyporesponsiveness" und Superinduktion	9
1.1.5.3.	Interaktion von Interferon mit anderen Lymphokinen und Monokinen	10
1.1.6.	Vorkommen von Interferon im gesunden und kranken Menschen	13
1.2.	Immune surveillance (Immunüberwachung) - eine Hypothese der Tumorimmunologie	14
1.3.	Entwicklung der hämatopoetischen Zellen und ihre maligne Entartung	15
1.4.	Fragestellung	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1.	(Bio-) Chemikalien, Lösungen, Medien und Arbeitsgeräte	23
2.2.	Testpersonen	29
2.3.	Zellseparationen aus peripherem Blut und Knochenmark	32
2.3.1.	Isolierung und Kryopräservierung von Lymphozyten	32
2.3.2.	Entfernung adhärenter Zellen	33
2.3.3.	Trennung von T- und B-Lymphozyten	33
2.3.4.	Trennung von Zellsubpopulationen	34

Seite

2.4. Analyse von Zelloberflächendeterminanten 37

2.5. Stimulation von Lymphozyten zur Proliferation 38
2.5.1. Gemischte Lymphozytenkultur (MLC) 38
2.5.2. Lymphozytentransformationstest (LTT) 38
2.5.3. Vollbluttest (VBT) 39

2.6. Stimulation von Lymphozyten zur Lymphokinproduktion 40
2.6.1. Interferonproduktion 40
2.6.2. Interleukin 2-Produktion 40

2.7. Interferonbestimmung in Zellkulturüberständen 41
2.7.1. Quantitativer Nachweis 41
2.7.2. Qualitativer Nachweis 41

2.8. Interleukin 2-Bestimmung in Zellkulturüberständen 42
2.8.1. Herstellung von kultivierten T-Zellen 42
2.8.2. Quantitativer Nachweis 42

2.9. Darstellungsweise der Ergebnisse und statistische Auswertung 43

3. ERGEBNISSE 44

3.1. Interferonproduktion und Lymphoproliferation in der MLC 44
3.1.1. Inhibition der Stimulatorzellen 44
3.1.2. Einfluß unterschiedlicher Kulturmedien 44
3.1.3. Zeitkinetiken 45
3.1.4. Einfluß von Zusätzen zur MLC 46
3.1.5. Einfluß von HLA-Antigenen auf die MLC 49

3.2. Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Lymphoproliferation im VBT und LTT 50
3.2.1. Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen 50
3.2.2. Aktivität kryopräservierter Lymphozyten 55
3.2.3. Vergleich der Lymphokinproduktion und Lymphoproliferation im VBT und LTT bei Kontrollspendern 56
3.2.4. Anwendung des VBT bei Patienten und Vergleich mit dem LTT 66

Seite

3.3. Interferonproduktion durch periphere Blutlymphozyten und Knochenmarkzellen; Vergleich mit der Interleukin 2-Produktion und der Proliferation 69
3.3.1. Untersuchung an gesunden Kontrollpersonen 69
3.3.2. Untersuchung an Patienten mit soliden Tumoren 69
3.3.3. Untersuchung an Patienten mit nicht-leukämischen hämatologischen Erkrankungen 73
3.3.4. Untersuchung an Patienten mit lymphatischen Leukämien 74
3.3.5. Untersuchung an Patienten mit myeloischen Leukämien 75

3.4. Fähigkeit von Zellsubpopulationen aus peripherem Blut und Knochenmark zur Interferonproduktion; Vergleich mit der Interleukin 2-Produktion und Proliferation 84
3.4.1. B-Zellen 84
3.4.2. T-Zellen 85
3.4.3. OKM-positive Zellen 86

3.5. Qualitative Analyse des von peripheren Blutlymphozyten oder Knochenmarkzellen gebildeten Interferons 95

4. DISKUSSION 97

4.1. Interferonproduktion und Lymphoproliferation in der MLC 97

4.2. Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Lymphoproliferation im VBT und LTT 98

4.3. Interferonproduktion durch mononukleäre Zellen aus dem PB und KM; Vergleich mit der Interleukin 2-Produktion und der Proliferation 102
4.3.1. Untersuchung an gesunden Blutspendern 102
4.3.2. Untersuchung an Tumorpatienten 105
4.3.2.1. Patienten mit soliden Tumoren 105
4.3.2.2. Patienten mit nicht-leukämischen hämatologischen Erkrankungen 106
4.3.2.3. Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) 108
4.3.2.4. Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL) 109
4.3.2.5. Patienten mit Myeloischen Leukämien 110

Seite

4.4. Fähigkeit von Subpopulationen aus PB und KM zur Interferon- und Interleukin 2-Produktion 112
4.4.1. B-Zellen 112
4.4.2. T-Zellen 113
4.4.3. Myeloische Zellen 118

5. AUSBLICK 119

6. ZUSAMMENFASSUNG 121

7. LITERATUR 123

1. EINLEITUNG

1.1. Das Interferon-System

Interferon (IFN) wurde im Jahr 1957 von Isaacs und Lindenmann als antivirales Agens, gebildet von Zellen in Antwort auf eine Virusinfektion, identifiziert und definiert (76 , 77). Schon lange vorher war das Phänomen der viralen Interferenz bekannt; es drückt aus, daß nach einer viralen Infektion eine Infektion und damit Vermehrung eines zweiten Virus gehemmt werden kann. Heute kennt man eine Vielzahl von Interferon-Effekten, sowohl in vivo als auch in vitro. Die Interferone sind eine große Gruppe heterogener Glykoproteine mit artspezifischer Glykosylierung (52) und werden seit 1980 definiert als Proteine, die in vitro einen virusunspezifischen, jedoch wirkungsspezifischen antiviralen Effekt zumindestens in homologen Zellen ausüben, und das mittels zellulärer Stoffwechselprozesse, die zur Neusynthese von RNA und Protein führen (179). Die Interferone gehören zu den Lymphokinen, da sie immunregulatorische Funktionen ausüben und Produkte von Leukozyten sind (97).

1.1.1. Klassifizierung und Charakterisierung der humanen Interferone

Die humanen Interferone werden heute auf Grund unterschiedlicher antigener Determinanten eingeteilt in

IFN-α (alte Bezeichnung: Leukozyten-IFN; von Leukozyten gebildet)

IFN-β (alte Bezeichnung: Fibroblasten-IFN; von Fibroblasten gebildet)

IFN-γ (alte Bezeichnung: Immun-IFN; von Lymphozyten gebildet).

IFN-α und -β wurden früher auch Typ I-Interferon genannt und dem IFN-γ (Typ II-Interferon) gegenübergestellt.

IFN-β und -γ wirken spezies-spezifisch, IFN-α ist dagegen auch über die Spezies-Grenzen hinaus aktiv.

Die verschiedenen antigenen Determinanten der Interferone erlauben eine Charakterisierung durch spezifische Antisera oder, in jüngster Zeit, durch monoklonale Antikörper. In ihren physiko-chemischen Eigenschaften

sind sich die 3 Interferonarten weitgehend ähnlich. IFN-α und -β besitzen ein Molekulargewicht von 16-20 KD. Die nicht-kovalent gebundenen, durch Prozession eines einzelnen Genprodukts entstehenden 2 Untereinheiten des Dimers IFN-γ (50-60 KD) haben ein MG von 20 und 25 KD (218). Im Gegensatz zu den beiden anderen Interferonen ist IFN-γ gegenüber einem pH-Wert <2 und >10, gegenüber Hitzeeinwirkung (60 min. bei 56°C) und Trypsin unbeständig (197).

In den letzten Jahren wurden die Interferone molekularbiologisch charakterisiert, die Aminosäuresequenzen analysiert, die Gene kloniert und in Bakterien exprimiert (40, 66,152,182). Für die mindestens 12 unterschiedlichen Proteine der α-Interferon-Klasse (Länge jeweils 166 Aminosäuren) kodiert eine aus 20 Genen bestehende Multi-Gen-Familie auf dem Chromosom 9; innerhalb der α-IFNe besteht eine 80-95%ige Basensequenzhomologie (173,190). Das Gen für das ebenfalls aus 166 Aminosäuren bestehende Interferon-β liegt gleichfalls auf Chromosom 9 und zeigt 28% Homologie gegenüber den IFN-α-Genen (182).

Charakteristisch für die IFN-α und -β-Gene ist das Fehlen von Introns. - Das Gen für das 146 Aminosäuren ausmachende IFN-γ liegt auf Chromosom 12, besitzt 3 Introns und ist nicht sequenzhomolog mit den IFN-α- und -β-Genen (66). Eine Sonderstellung nimmt IFN-γ auch bezüglich des zellulären Rezeptors ein: während Interferon-α und -β einen gemeinsamen Rezeptor auf der Zelloberfläche besitzen, bindet IFN-γ an einen separaten Rezeptor (25).

Kürzlich wurde von einer vierten Interferon-Klasse, genannt IFN-δ, berichtet. Sie unterscheidet sich in den antigenen Determinanten, in biologischen und physikochemischen Eigenschaften von den übrigen Interferonen: IFN-δ ist pH2-stabil, wirkt spezies-spezifisch und nur in Trisomie 21-Fibroblasten und wird von Leukozyten nach Stimulation mit PHA plus Teleocidin, einem Tumorpromoter, gebildet (212,213).

Ein weiterer Interferon-Typ wurde in jüngster Zeit beschrieben: er besitzt den antigenen Charakter von IFN-α, aber die Säurelabilität des γ-IFNs. Dieses säurelabile IFN-α wurde auch in Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen und mit dem Acquired Immune Deficiency Syndrome gefunden (11, 41,156).

1.1.2. Eigenschaften der Interferone

1.1.2.1. Antiviraler Mechanismus

Nach der Bindung von Interferon an die Rezeptoren auf der Membran einer Zielzelle (ca. 2400 hochaffine Bindungsstellen für IFN-γ wurden z.B. auf menschlichen Fibroblasten nachgewiesen) wird der IFN-Rezeptor-Komplex bei 37°C schnell internalisiert und degradiert (192). Es folgt eine „down regulation",dadurch eine verringerte Expression der Interferon-Rezeptoren und, vermutlich, eine Refraktärzeit für die Stimulierbarkeit der Zelle mit Interferon (4).

Eine Serie von biologischen Phänomenen wie die Beeinflussung von Virusreplikation, Zellproliferation und immunologischen Prozessen wird durch die de novo Synthese von RNA und Polypeptiden in der Zelle nach Einwirkung von IFN eingeleitet. IFN-α, -β und -γ induzieren die Neubildung mindestens 12 gemeinsamer Proteine, IFN-γ induziert zusätzlich 6 andere Polypeptide (209). Unter anderem werden die Enzyme 2'-5'Adenylatsynthetase und Proteinkinase aktiviert, die, nach Kontakt mit viraler doppelsträngiger (ds)RNA im Zytoplasma, zu einem Abbau von viraler m-RNA und zur Inaktivierung des ribosomalen Peptidketteninitiationsfaktors eIF-2 führen und damit die virale Replikation verhindern (97,113). Das Ausmaß der Enzyminduktion und damit der Einfluß von IFN scheint in verschiedenen Zelltypen und Individuen zu variieren (61); der Übertragungsmechanismus für das nach Bindung an den Rezeptor durch Interferon initiierte Signal ist noch unklar, beruht aber eventuell auf einer Kooperation zwischen erhöhtem intrazellulären Ca^{2+} und aktivierter Proteinkinase C (208).

1.1.2.2. Immunregulatorische Wirkung

Die Interferone haben neben ihrer antiviralen Aktivität eine große Bedeutung als natürlich vorkommende Regulatormoleküle, wobei hier IFN-γ besonders hervorzuheben ist. Diese regulatorischen Effekte, teils fördernd und teils hemmend, wirken auf eine optimale Abwehr körperfremder Substanzen hin und wurden in einer Vielzahl von Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben.

Die Wirkung der Interferone auf das zelluläre Immunsystem beinhaltet,

stark vereinfacht, eine Suppression des proliferativen Schenkels und eine Aktivierung des Effektorschenkels der Immunantwort:
die Antigen-, Mitogen- und Alloantigen-induzierte Zellproliferation wird inhibiert (115,130), die Antigen-induzierte B-Zell-Antwort wird vermindert (26); die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen und die Reifung von Monozyten werden gehemmt (28,222). Durch Interferon erhöht werden andererseits z.B. die IgE-vermittelte Histaminausschüttung, die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität und die Aktivität der Natürlichen Killer (NK-) Zellen (70,183). Ferner kommt es unter IFN-Gabe zu einer allgemeinen Aktivierung von Monozyten mit erhöhtem Metabolismus, verstärkter Phagozytoseaktivität,Ia- und Fc-Rezeptor-Expression und Interleukin 1-Produktion, aber verringerter Prostaglandinausschüttung (8 , 47). Interferon kann daher auch als "macrophage activating factor" (MAF) bezeichnet werden (171).

Interferon-γ kann eine Aktivierung und Differenzierung myelomonozytärer Zellen bewirken (36), ferner als Helfer- und Maturationsfaktor für B-Zellen agieren (192). Ein weiterer wichtiger Effekt von Interferon ist die Wirkung auf Zellmembranen:Oberflächenmoleküle wie Fc-Rezeptoren, β-2 Mikroglobulin und vor allem Histokompatibilitätsantigene werden nach Interferoneinwirkung verstärkt exprimiert (3,116).
Während Klasse I-Antigene durch alle Interferone auch de novo induziert werden, kann von den natürlichen Interferonen nur IFN-γ zur Neusynthese von Klasse II-Antigenen z.B. auf humanen Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten und Melanozyten führen (14,166,192,194). Auch die Expression von Interleukin 2- und Transferrin-Rezeptoren wird durch Interferon moduliert (18, 84).

1.1.2.3. Anti-Tumor-Wirkung

Interferon übt einen zytostatischen Effekt auf maligne und auch normale Zellen aus, indem es die Zellteilungsrate durch Verlängerung aller Phasen des Zellzyklus reduziert. Neben dieser direkten Wirkung resultiert ein zusätzlicher Anti-Tumor-Effekt aus einer Aktivierung der zellulären Abwehr, von T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen, die alle, zumindest in vitro, Tumorzellen zerstören können. Weitere Beispiele für die Anti-Tumor-Wirkung in vitro und in vivo, im Tiermodell und bei Ver-

wendung von Zellinien sind (10, 27, 67, 95, 97) zu entnehmen. Klinische Studien der Phase I bis III zeigen den Behandlungserfolg mit Interferon in einigen malignen Erkrankungen (125,126). Aus neueren Studien mit Colon-Ca- und Leukämie-Zellinien (195) wird deutlich, daß die Tatsache, daß nicht jede Zelle auf Interferon reagiert, nicht mit der Anzahl von IFN-Rezeptoren auf der jeweiligen Zellmembran korreliert werden kann. Die Anzahl von γ-IFN-Rezeptoren auf humanen Tumorzellinien schwankt in hohem Maße (400-15.000 pro Zelle), dagegen scheint die Affinität für den γ-IFN-Rezeptor auf den genannten Zellinien vergleichbar zu sein (K_D:1-5x10^{-10}M).

1.1.3. Interferon-produzierende Zellen

Die Frage nach den Zellen des Immunsystems, die in der Lage zur Interferonproduktion sind, ist noch nicht endgültig geklärt. Ein Interferon-Subtyp scheint jedoch nicht durch eine einzige Zellpopulation gebildet zu werden, eher sind unterschiedliche Leukozytensubtypen fähig zur Produktion desselben Interferontyps. Die klassische Einteilung der Interferone in „Leukozyten-" und „Fibroblasten-Interferon" wurde in der neuen Nomenklatur aufgehoben, da sich sowohl lymphoblastoide Nawalma-Zellen als auch Fibroblasten zur Bildung von IFN-α und -β fähig zeigten (98).

- Die Bildung von α-Interferon wurde beschrieben durch Kulturen von virusinduzierten T-Zellen oder Makrophagen (15,167), ferner von Large Granular Lymphocytes (LGL), NK-Zellen und Nullzellen (92, 98). Ob nur transformierte B-Zellinien (wie die Nawalma-Zellen) oder auch normale humane B-Zellen zur Interferonproduktion in der Lage sind, ist ungeklärt. Zur Abklärung erschwerend hinzu kommt die Tatsache, daß auch Mykoplasmen, häufige Kontaminanten von Zellinien, zur Interferonproduktion fähig sind (23).
- Die Bildung von Interferon-β ist außer in Fibroblastenkulturen und lymphoblastoiden Zellinien auch in Mitogen-stimulierten Leukozytenkulturen beschrieben worden (98).

Für die Produktion von Interferon-γ im humanen wie im murinen System sind vor allem die T-Lymphozyten verantwortlich (107,120,136). Dabei scheinen langlebige T-Zellinien ohne Helferzellen auszukommen, während frisch isolierte T-Zellen die Unterstützung von Monozyten benötigen

(7 , 31,123). Innerhalb der T-Zell-Subpopulationen produzieren sowohl Helfer- als auch Suppressor-Zellen Interferon in Antwort auf Alloantigene oder Mitogene, lösliche Antigene scheinen v.a. Helferzellen zur IFN-Bildung anzuregen (22, 54,170). Nach geeigneter Stimulation werden auch OKT11, OKM-positive Zellen oder NK-Zellen zu Interferon-γ-Produzenten (141,191). Während murine Thymozyten nach Mitogenstimulation als gute Interferonproduzenten beschrieben sind (119), bedarf es bei menschlichen Thymozyten eines Zusatzes von Produkten B-lymphoblastoider Zellinien zur Interferon-γ-Induktion (159).
Obgleich eine endgültige Charakterisierung der Interferon-produzierenden Zellen noch aussteht, ist anzunehmen, daß mehrere Subpopulationen und Differenzierungsstadien von T-Lymphozyten in der Lage sind, Interferon zu bilden.

1.1.4. Interferon-Induktoren

Interferon wird normalerweise gar nicht oder nur in sehr geringem Maße spontan oder konstitutiv produziert, vielmehr muß seine Bildung induziert werden. Die Produktion von Interferon-α und -β wird durch Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Rickettsien und Parasiten stimuliert. Auch synthetische, doppelsträngige RNA (z.B. Polyriboinosinylsäure-Polyribocytidylsäure,Poly I:C) und einige Chemikalien mit geringem Molekulargewicht (z.B. 10-Carboxymethyl-9-Acridanon, CMA) sind gute IFN-Induktoren (97). Die Produktion von Interferon-γ wird in vitro offenbar unter allen Bedingungen stimuliert, die zu einer (normalerweise als Proliferation gemessenen) Aktivierung von T-Zellen führen. Darunter fällt die Induktion mit Viren und Bakterien (wie z.B. die Tetanus- und Diphtherietoxine, oder die Staphylococcus-Enterotoxine A und B, 203). Ferner werden humane und murine Lymphozyten durch das Mitogen MAS aus dem Überstand von Mycoplasma arthritidis-Kulturen, zuerst beschrieben von Cole et al. (34), zur IFN-γ-Bildung angeregt. Im murinen System steht die lymphoproliferative Antwort auf MAS unter der genetischen Kontrolle der I-Region des H-2-Komplexes (33). Am häufigsten wird γ-IFN durch polyklonal stimulierende Mitogene induziert, deren Prototypen PHA (Phytohämagglutinin, aus Phaseolus vulgaris), Con A (Concanavalin A, aus Canavalia ensiformis) und PWM (Pokeweed mitogen, aus Phytolacca ameri-

cana) darstellen (211), zu denen aber auch andere pflanzliche Lektine, wie z.B. jenes aus Lens culinaris zu rechnen sind. Die Mitogene binden an Zukkerreste auf der Oberflächenmembran, PHA bindet z.B. an Galactosereste, die mit dem 20 KD-Molekül des T3-Komplexes assoziiert scheinen (196). Daraufhin werden ruhende Lymphozyten, die sich in der Go-Phase des Zellzyklus befinden, aktiviert und RNA- und Proteinsynthese, u.a. von Interferon-γ, induziert (99).

Auch monoklonale Antikörper mit mitogener Aktivität, wie z.B. OKT3, induzieren die Synthese von IFN-γ. Sie binden wahrscheinlich an mindestens einen Bestandteil des aus 3 durch die Membran reichenden Polypeptiden bestehenden T3-Komplexes (31,128,202) und aggregieren die Epitope, während gleichzeitig Kontakt zu einer Fc-Rezeptor-tragenden „accessory cell" hergestellt wird, welche bei unterschiedlichen Individuen Polymorphismus für unterschiedliche IgG-Subklassen zeigen kann(184). Weitere Interferon-γ-Induktoren im humanen System sind die als Mitogene wirkenden Tumorpromotoren und Phorbol-Diester TPA (12 O-Tetradekanylphorbol-13-acetat), auch PMA (Phorbolmyristatacetat) genannt, oder, strukturell nicht verwandt, das Alkaloid Teleocidin. Vor allem in Verbindung mit konventionellen Mitogenen wie PHA wirken die Tumorpromotoren stark mitogen und erzeugen hohe IFN-Titer (217, 219). Es ist jetzt evident, daß der Erhöhung des intrazytoplasmatischen Ca^{2+}-Spiegels nach Triggerung des Rezeptors durch Mitogene oder Antigene eine Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat in 1,2-Diazylglyzerol und Inositol-Triphosphat vorausgeht.Letzteres bewirkt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, ersteres wirkt auf Proteinkinase C. TPA selbst ist strukturell dem 1,2-Diazylglyzerol ähnlich und scheint an Proteinkinase C als Rezeptor zu binden (193).

Phorbolester ersetzen bei der T-Zell-Aktivierung durch Mitogene das von Monozyten bzw. T-Helferzellen stammende Interleukin-1 und -2 (78, 83). Es handelt sich offensichtlich um einen Kaskadeneffekt, in dem die anfängliche Synthesesteigerung eines Proteins die Produktion anderer Mediatoren fördert.

Auch durch allogene Stimuli, also durch die Kokultivierung von Zellen unterschiedlicher Individuen in einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC) wird Interferon-γ induziert. Diese Interferonsynthese ist eine Funktion von T-Lymphozyten, in der Maus unabhängig von der Lymphoproli-

feration und abhängig von Differenzen im K-, D- oder I-Lokus der Histokompatibilitätsregion H-2 (98). Die γ-Interferonproduktion in der humanen MLC wurde von drei Arbeitsgruppen untersucht (6,118,151), es resultierten geringere IFN-Titer als in der Maus und die Ergebnisse waren schwer zu reproduzieren. Da die MLC ein in vitro-Modell für die Transplantatabstoßung darstellt, ist die Frage interessant, ob die Produktion von γ-Interferon einen Nebeneffekt in der Alloantigenerkennung darstellt oder wirklich eine immunregulatorische Rolle besitzt. Die Daten von Farrar (54) lassen vermuten, daß IFN-γ bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten von Wichtigkeit ist.
Auch in der autologen MLC (AMLC), einem Modell für die Autoimmunität, in der stimulierende und antwortende Zellpopulationen aus demselben Individuum stammen, wurde in der Maus neben Lymphoproliferation Produktion von γ-IFN beschrieben (99). Auch in der humanen AMLC wurde die Synthese von γ-Interferon gefunden (9), dies konnte von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht bestätigt werden (118). In der gemischten Kultur aus Lymphozyten und Tumorzellen wurde ebenfalls Produktion von Interferon beschrieben (99 , 153). Obgleich ein Teil des gebildeten Interferons im Nachhinein wahrscheinlich auf die die Tumorzellinien kontaminierenden Mykoplasmen zurückzuführen ist (13, 23), sind doch zum Beispiel (mykoplasmafreie) myeloische Linien wie K562 in der Lage, in Lymphozyten die γ-Interferon-Produktion anzuregen (17).

Auch Interleukin-2 bewirkt die Synthese von γ-Interferon und verstärkt die Mitogen-induzierte IFN-Produktion (54, 93). Dies läßt vermuten, daß eine bestimmte Konzentration an endogen produziertem oder exogen hinzugefügtem Interleukin-2 für die optimale Interferon-γ-Produktion durch humane mononukleäre Zellen notwendig ist.

In vivo wurde Interferon-γ im Serum von Mäusen nach Immunisierung entdeckt, wobei stammspezifische Differenzen in der IFN-Produktion bestehen (99). In menschlichen Seren wurde Interferon zum Beispiel in Patienten mit Autoimmunerkrankungen beschrieben (72 , 156).

Durch Klonierung und Expression der humanen Interferongene in Bakterien können heute große Mengen an Interferon hergestellt und zum Beispiel in klinischen Studien eingesetzt werden.

1.1.5. Regulation und Kontrolle des Interferon-Systems

Die Produktion von Interferon, v.a. durch die zellulären Komponenten des Immunsystems, unterliegt in vivo einer fein geregelten Kontrolle. Dies ist notwendig, da sich herausgestellt hat, daß hohe Dosen von Interferon toxisch sind.

1.1.5.1. Genetische Kontrolle der Interferonproduktion

Die Produktion von IFN-α und -β nach Virusinduktion in Mäusen wird, je nach Virusart, durch unterschiedliche Gene kontrolliert, die Antwort auf Herpes Simplex Virus z.B. wird beeinflußt durch einen Lokus auf dem X-Chromosom (38 , 221). Der murine H-2-Lokus kontrolliert die γ-Interferon-Synthese sowohl in der MLC als auch nach Stimulation mit dem Mykoplasmaprodukt MAS (33, 106). Im Menschen zeigte sich, daß dieselben T-Zell-Klone nach Antigen- oder Mitogenstimulation IFN-γ, nach Induktion mit Viren aber IFN-α synthetisieren können. Dies deutet auf eine unabhängige Regulation des IFN-γ-Gens vom IFN-α/β-Gen-Komplex hin (192).

1.1.5.2. „Priming", „Blocking", „Hyporesponsiveness" und Superinduktion

Schon 1958 wurde von Isaacs et al. festgestellt, daß durch eine Vorbehandlung von Zellen mit Interferon eine daraufhin stimulierte IFN-Produktion verstärkt wird - dies bezeichnet man als „priming". Andererseits verhindert eine Vorinkubation mit hohen Dosen Interferon die anschließend induzierte IFN-Synthese, was „blocking" genannt wird.
In vivo ist ein ähnlicher Effekt festzustellen, nämlich das Fehlen der Reaktion auf einen Interferon-Induzenten kurz nach vorheriger Applikation desselben Induzenten („hyporesponsiveness").
Als Superinduktion schließlich bezeichnet man eine Methode zur verstärkten Produktion von Interferon in Fibroblastenkulturen: nach Stimulation z.b. mit Poly I:C fügt man den Zellen einen DNA- oder Proteinsynthesehemmstoff (wie Actinomycin C oder Cycloheximid) zu, was zu einer erhöhten Interferonsynthese führt. Der Grund liegt in einer Verlängerung der Halbwertszeit der Interferon m-RNA und evtl. darin, daß der Repressor für die m-RNA nicht produziert werden kann (97).

1.1.5.3. Interaktion von Interferon mit anderen Lymphokinen und Monokinen

Die verstärkende Wirkung von Interleukin-2 (IL-2) bei der Synthese von γ-Interferon wurde schon unter 1.1.4. erwähnt. Interleukin-2, auch T Cell Growth Factor (TCGF) genannt, ist ein Glykoprotein mit MG von 15,5 KD. Es spielt eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Proliferation aktivierter T-Zellen, was durch Interaktion des Faktors mit hochaffinen Membranrezeptoren vermittelt wird. IL-2 wird im Menschen sowohl von Helfer- als auch von Suppressor-T-Zellen (127) in Antwort auf T-Zell-Mitogene gebildet; durch zusätzliche Stimulation mit Zellinien wird die IL 2-Produktion verstärkt (65). Das humane IL 2-Gen wurde kloniert, sequenziert (60) und auf dem Chromosom 4 lokalisiert. Weder Interleukin-2 noch seine Rezeptoren werden von ruhenden T-Zellen produziert, es muß vielmehr nach Antigen- oder Mitogenbindung zuerst eine Aktivierung der Zellen eintreten.

Für die Aktivierung von T-Zellen generell und für die Expression von IL 2- und IFN-γ-Genen speziell sind mindestens zwei Signale notwendig. Das erste Signal wird durch Antigene, Mitogene, Antikörper gegen T3 oder Calcium-Ionophore in Verbindung mit Molekülen, die durch die Gene des Histokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert werden, vermittelt. Das zweite Signal bilden von „accessory cells" freigesetzte lösliche Faktoren, wie Interleukin-1 und -2. Diese können durch Phorbolester, wie z.B. TPA, ersetzt werden (210,214). Studien lassen vermuten, daß die für eine maximale T-Zell-Aktivierung notwendigen unterschiedlichen Signale über einen gemeinsamen Weg reguliert werden.

IL 2-Rezeptoren erscheinen 4-8 Stunden nach PHA-Stimulation auf der Zellmembran, erreichen quantitativ ihre maximale Expression nach 2-3 Tagen und fallen nach 7-13 Tagen auf 5-20% der maximalen Expression zurück. Restimulation von Zellen, die die Mehrheit der IL 2-Rezeptoren verloren haben, mit Lektin oder geeignetem Antigen resultiert in einer Erhöhung der Anzahl der exprimierten IL 2-Rezeptoren (39). Auch aktivierte B-Zellen tragen Interleukin 2-Rezeptoren. Die Interaktion von Interleukin-2 mit seinem zellulären Rezeptor bewirkt offenbar eine schnelle, zeitweilige Verlagerung von Proteinkinase C aus dem Zytosol zur Plasmamembran (55); dadurch wird eine zelluläre Proliferation, d.h.der Übergang der Zellen von der G_1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase in Gang gesetzt, was wiederum zu Wachstum und Entwicklung von

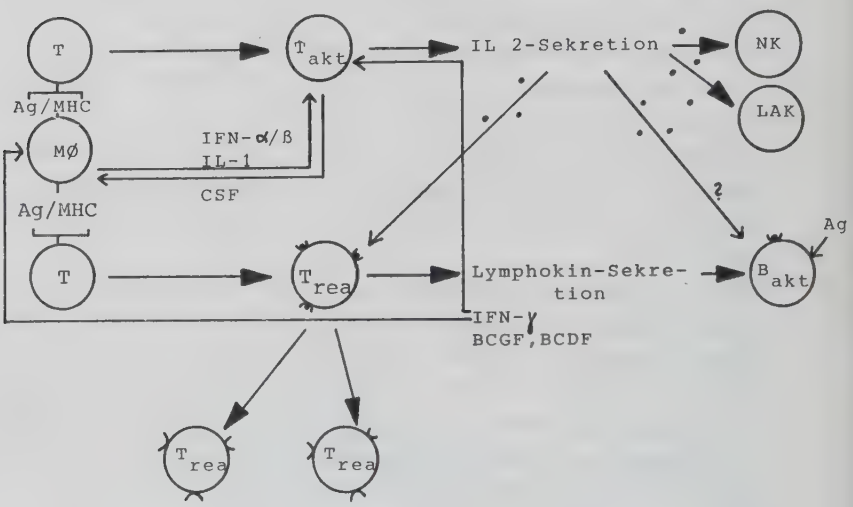
Helfer-, Suppressor- und zytotoxischen T-Zellen, zur Erhöhung der NK-Zell-Aktivität (88) und zur Regulation der Antikörpersekretion von B-Zellen führt. Interleukin-2 selbst kann die Transkription und Expression seines eigenen Rezeptors erhöhen. Die Induktion der IL 2-Rezeptor-Expression und die Menge des produzierten Interleukin-2 stellen auf diese Weise in vivo und in vitro Regulationsmechanismen für die Spezifität und Stärke der Immunantwort dar (165,176).

Die Helfer-Effekte von Interleukin-2 bei der γ-Interferon-Produktion durch T-Zellen sind Calcium-abhängig (85), wobei die Bildung von Arachidonsäure aus Phospholipiden offenbar einer der Calcium-vermittelten Schritte ist.

Ähnlich wie IL-2 die γ-IFN-Synthese beeinflußt, verstärkt auch Interferon-γ (IFN-α/β in geringerem Maße) die Interleukin 2-Produktion in PHA-stimulierten Kulturen humaner mononukleärer Zellen (201). Dies kann entweder ein direkter Effekt von IFN-γ auf IL 2-produzierende T-Lymphozyten sein, oder indirekt über eine Erhöhung der Interleukin 1-Produktion erfolgen.Da IL-1 seinerseits die Mitogen-induzierte Interleukin 2-Synthese in T-Zellen fördert (174), mag der primäre Effekt von γ-Interferon eine Steigerung der Interleukin 1-Produktion sein.

Ein weiterer Mechanismus zur Regelung der IFN-Produktion betrifft die Makrophagen, die im intakten Organismus eine wichtige Quelle von α- und β-Interferon zu sein scheinen. Ihre Interferonproduktion wird durch von Lymphozyten gebildetes CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) reguliert (201), während das Makrophagenprodukt Interleukin-1 seinerseits die γ-IFN-Produktion durch Lymphozyten beeinflußt. Diese komplexe Makrophagen-T-Lymphozyten-Interaktion, die zwischen Interferonen, anderen Lymphokinen und Monokinen wirksam ist (siehe Abbildung 1), wird in vivo durch supprimierende Signale kontrolliert. So sind einige der dargestellten Wechselwirkungen dosisabhängig: hohe Dosen von Interleukin-2 oder Prostaglandin E_2 (200) wirken inhibitorisch auf die γ-Interferonproduktion, ebenso sind große Mengen an γ-Interferon wachstumshemmend für Makrophagen und Lymphozyten. Auch Suppressor-T-Zellen sind offenbar an der Regulation der humanen γ-Interferon-Synthese beteiligt (148).

Abb.1 Beteiligung unterschiedlicher Lymphokine und Monokine an der Immunantwort*



Legende

T_{akt}	:aktivierte T-Zelle; B_{akt} :aktivierte B-Zelle
T_{rea}	:auf IL-2 reagierende T-Zelle
NK	:Natürliche Killerzelle; MØ: Makrophage
LAK	:durch Lymphozyten aktivierte Killerzelle
IL-1	:Interleukin-1
IL-2	:Interleukin-2
IFN	:Interferon
CSF	:Colony Stimulating Factor
BCGF	:B Cell Growth Factor
BCDF	:B Cell Differentiation Factor
Ag	:Antigen
MHC	:Proteine des "Major Histocompatibility Complex"

*aus :Robb,J.R.(1984),Immunol.Today 5,203 (verändert)

1.1.6. Vorkommen von Interferon im gesunden und kranken Menschen

Im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten ist in Abwesenheit eines induzierenden Stimulus (z.B. bei Virusinfektion) normalerweise kein Interferon nachzuweisen. Im Gegensatz dazu besitzen Patienten mit akuten viralen Erkrankungen hohe lokale und systemische IFN-Titer, die zur Begrenzung der Infektion führen; die peripheren Blutlymphozyten befinden sich in 70% der Fälle in einem antiviralen Zustand (114). Auch in Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen und AIDS ist Interferon vorhanden (41, 72,156), was zu einer Diskussion der Rolle von Interferon in der Autoimmunität führte (97).

Defekte im Immunsystem, wie sie z.B. bei Neugeborenen, bei Kindern mit erblichen Infektionen, bei persistenten EBV-Infektionen oder bei Patienten mit dem Interferon-Defekt-Syndrom vorliegen, bewirken das völlige Fehlen von γ-IFN im Körper. Patienten mit Hepatitis oder mit verschiedenen malignen hämatopoetischen Erkrankungen zeigen verringerte Interferon-Titer (180).

Antikörper gegen Interferon sind bei Individuen, die niemals mit IFN therapiert wurden, selten: sie wurden gefunden in Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes und in Nabelschnurblut (147). Von den mit Interferon behandelten Patienten entwickelt nur ein kleiner Prozentsatz Antikörper, dennoch zeigt dies den antigenen Charakter von Interferon.

- Eine Erklärung für das natürliche Auftreten von anti-Interferon-Antikörpern, wie z.B. im Nabelschnurblut, wäre eine physiologische Regulation und Kontrolle der Interferon-Konzentration im Körper - hohe Dosen Interferon sind toxisch.

1.2. Immune surveillance (Immunüberwachung) - eine Hypothese der Tumorimmunologie

Die Theorie der "immune surveillance" geht zurück auf Paul Ehrlich (1909), der annahm, daß Tumoren häufig entstehen, daß sie aber im Anfangsstadium durch das Abwehrsystem unterdrückt und am Wachstum gehindert werden. Ein wachsender Tumor spiegelt demnach einen Defekt in der Immunüberwachung wieder (100).
1970 postulierte Burnet eine große Rolle der T-Lymphozyten in der Tumorabwehr durch Erkennung spezifischer Antigene auf den Tumorzellen. Diese Forderung setzt die Existenz von Tumorantigenen voraus, was für das humane System stark angezweifelt wird - nur Melanome scheinen Tumorantigene zu besitzen (140).
Eine andere Theorie vermutet das Vorhandensein einer nicht T-Zell-vermittelten, unspezifischen Abwehr (96); die Effektorzellen sind Natürliche Killer-(NK-)Zellen, welche in der Lage sind, Targetzellen ohne vorherige Immunisierung zu lysieren (19) und Makrophagen, die Tumorzellen phagozytieren und ebenfalls lysieren (35). Sowohl NK-Zellen als auch Makrophagen werden durch Interferon aktiviert (8 ,183), wodurch die anti-Tumor-Wirkung des Interferons teilweise zustandekommt.
Für eine unspezifische Abwehr spricht die Tatsache, daß die Tumorhäufigkeit in thymektomierten Mäusen, die keine T-Zellen, aber NK-Zellen besitzen, nicht gesteigert ist (71). Anhaltspunkte für die Existenz einer Immunüberwachung gegen humane Tumoren sind z.B. (selten vorkommende) spontane Tumorregressionen (51). Auch werden die meisten Tumoren, vor allem im Frühstadium, von lymphoiden Zellen infiltriert, was in einzelnen Fällen zu einer Tumorregression führt (82).

- Die Gründe für die Entstehung von Tumoren trotz der Anwesenheit einer Immunabwehr mögen vielfältig sein: die Dichte der tumorassoziierten Oberflächenantigene kann zu gering sein, um eine Reaktion auszulösen; die Lymphozytenaktivität kann durch einen Defekt im zellulären Immunsystem, durch das Vorhandensein von Suppressorzellen, supprimierenden Faktoren oder Antigen-Antikörper-Komplexen eingeschränkt sein (96).

1.3. Entwicklung der hämatopoetischen Zellen und ihre maligne Entartung

Die charakteristische und essentielle Eigenschaft von Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung: ohne diese würde das hämatopoetische System schnell zugrundegehen, andererseits würde eine exzessive und ständige Selbsterneuerung (in Abwesenheit von Absterben oder Differenzierung) zu einer Reduktion in der Produktion reifer Zellen und zu einer Vermehrung primitiver Zellen führen, wie es bei manchen Leukämien der Fall ist (42). Das hämatopoetische System in Leukämie-Patienten ist überwiegend klonal (124).

Die Stammzellen des menschlichen Embryos entstehen im Dottersack (in der 2. und 3. Woche der Schwangerschaft) und wandern in der 6. Woche in das Parenchym der Leber, die dadurch zu dem wichtigsten blutbildenden Organ des Föten wird. Lymphoide Vorläuferzellen aus der Leber können sich sowohl selbst erneuern als auch reifen und gelangen später in die peripheren lymphoiden Organe, wo eine morphologische und funktionelle Differenzierung in T- und B-Zellen erfolgt.
Im erwachsenen Menschen findet die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen v.a. im Knochenmark statt; hier stehen sie in engem Kontakt mit Stromazellen, was für die Proliferation und Differenzierung notwendig zu sein scheint.

T-Zellen

Der Thymus wird als der wichtigste, wenn nicht der einzige Differenzierungsort für T-Lymphozyten von den frühesten Vorläufern hin zu den unterschiedlichen peripheren T-Effektorzellen angesehen. Unter den vermutlich intrathymisch ablaufenden Vorgängen sind: Spezifizierung von T-Zell-Subpopulationen, Bildung der Rezeptor-Diversität, Selektion der durch Selbst-MHC-Antigene restringierten T-Zell-Vorläuferzellen und Induktion der Selbst-Toleranz (205).
Während der fötalen Entwicklung wandern viele Vorläuferzellen aus der fötalen Leber in den Thymus; im Erwachsenen erhält der Thymus nur wenige Zellen aus dem Knochenmark, doch in Zeiten von Streß und nach Bestrahlung erfolgt eine massive Selbsterneuerung von Zellen aus dem Knochenmark im Thymus.

Der Thymus ist teilbar in Cortex, welcher 85% der gesamten Thymozyten enthält, und Medulla, welche die restlichen 15% beherbergt.
Die Kontrolle der Proliferation und frühen Differenzierung der T-Zellen in der Thymusdrüse ist wenig verstanden. Von dieser großen Population sich teilender Lymphozyten werden täglich ca. 30% ersetzt. Wichtiger als Wachstumsfaktoren sind hier offenbar die Interaktionen zwischen Blasten und nicht-lymphoiden Zellen im Thymus (172). Aus dem murinen Thymus konnten vielzellige Lympho-Stroma-Komplexe isoliert und analysiert werden (104). Es wurden in temporärer Folge Interaktionen von T-Zellen mit Makrophagen, mit Epithelzellen und mit dendritischen Zellen festgestellt. Aus diesen Beobachtungen an der Maus wurden Spekulationen über die intrathymische T-Zell-Reifung, die Zell-Zell-Kommunikation, die Kompartimentbildung und den Lymphozytenstrom angestellt:
frühe T-Zellen treten evtl. von der cortikalen Seite der Grenze zwischen Cortex und Medulla in den Thymus ein und interagieren zuerst mit Makrophagen im inneren Cortexbereich, später mit Epithelzellen des äußeren Cortex und, nach Einwanderung in die Medulla, mit Dendritischen Zellen (104). Die funktionell kompetenten T-Zellen werden in die peripheren Lymphbahnen entlassen.
Die T-Zell-Ontogenie wird von einer drastischen Änderung der zellulären Oberflächenantigene begleitet: die frühesten lymphoiden Thymozyten des Cortex sind $T9^+$, $T10^+$, während der Reifung werden sie $T9^-$, $T10^+$, $T6^+$, $T4^+$, $T8^+$. Die weiter in der Medulla reifenden Thymozyten werden $T6^-$ und $T3^+$, ehe sie in die Subpopulationen der T4-positiven Helfer-/Inducerzellen und der T8-positiven Suppressor-/Zytotoxischen Zellen segregieren. In diesem Stadium, also vor der Ausschleusung aus dem Thymus, besitzen die Zellen noch keine vollständige immunologische Kompetenz. Außerhalb des Thymus verlieren die ruhenden $T3,4^+$- oder $T3,8^+$-Zellen das T10-Antigen und stellen die zirkulierenden Helfer-/Inducer- oder Suppressorpopulationen dar. Der Schafserythrozytenrezeptor (SRBC), der durch anti-T11 erkannt wird, wird sowohl auf Thymozyten in allen Stadien als auch auf peripheren T-Zellen exprimiert (169).

Da die immunologische Kompetenz erst im letzten Stadium der intrathymischen Ontogenie erhalten wird, können eine verfrühte Entlassung der Zellen oder Aberrationen in der Zellreifung mit anschließender blok-

kierter Differenzierung zu Immundefekten führen. Die Analyse von humanen Leukozyten-Differenzierungs-Antigenen hat Studien an Leukämie- und Lymphomzellen sehr erleichtert.
Die Entwicklung der lymphatischen und myeloischen Zellen und ihre Beziehung zu malignen Erkrankungen ist schematisch in Abb. 2 dargestellt. Das Schema basiert auf dem Konzept, daß der Phänotyp der normalen hämatopoetischen Zellen auf der jeweiligen Stufe der Differenzierung in den meisten Fällen mit dem Phänotyp ihrer malignen Gegenstücke vergleichbar ist (57).

B-Zellen

Als anatomischer Ort der B-Zell-Reifung im Menschen, äquivalent der Bursa fabricii der Vögel, wird die fötale Leber oder das Knochenmark angenommen. - Kleine bis mittelgroße Ia- und BA-1-positive Zellen mit Terminaler Transferase (TdT) Enzymaktivität scheinen die lymphatischen Stammzellen zu sein, aus denen sich cALLA$^+$, B1$^+$, BA-1$^+$ Zellen, vermutlich die frühesten B-Zellen, entwickeln. Bei weiterer Reifung bilden sich Prä-B-Zellen, die geringe Mengen an zytoplasmatischen µ (cµ) schweren Ketten, aber keine leichten Ketten synthetisieren. Während der Differenzierung verlieren die B-Zellen TdT und beginnen, Oberflächen-Immunglobulin (sIg) zu exprimieren. B1 ist ein früher Marker, der auf der ganzen Linie von den TdT-positiven Zellen an zu finden ist.
- Die am meisten differenzierte B-Zelle, die Plasmazelle, produziert Ig, besitzt intrazytoplasmatisches Ig und exprimiert das T10-Antigen, während Oberflächen-Ig, Ia- und B-Zell-Antigene generell nicht zu finden sind (57).
- Nach Antigen-Kontakt kennzeichnet die Expression von IgM, IgD und IgG den Reifungsgrad der B-Zellen (siehe Abb. 2).
Die unterschiedlichen Formen der malignen B-Zell-Erkrankungen stammen wahrscheinlich von normalen Zellen variierender Reifungsgrade ab. Der Differenzierungsgrad innerhalb eines malignen Klons scheint variabel zu sein: manche malignen Zellen (z.B. bei Chronischer Lymphatischer Leukämie, CLL) sind offensichtlich fixiert und unfähig zur weiteren Entwicklung, während die lymphoiden oder lymphoplasmazytoiden Targetzellen z.B. in Myelomen in Plasmazellen differenzieren.

Myeloische Zellen

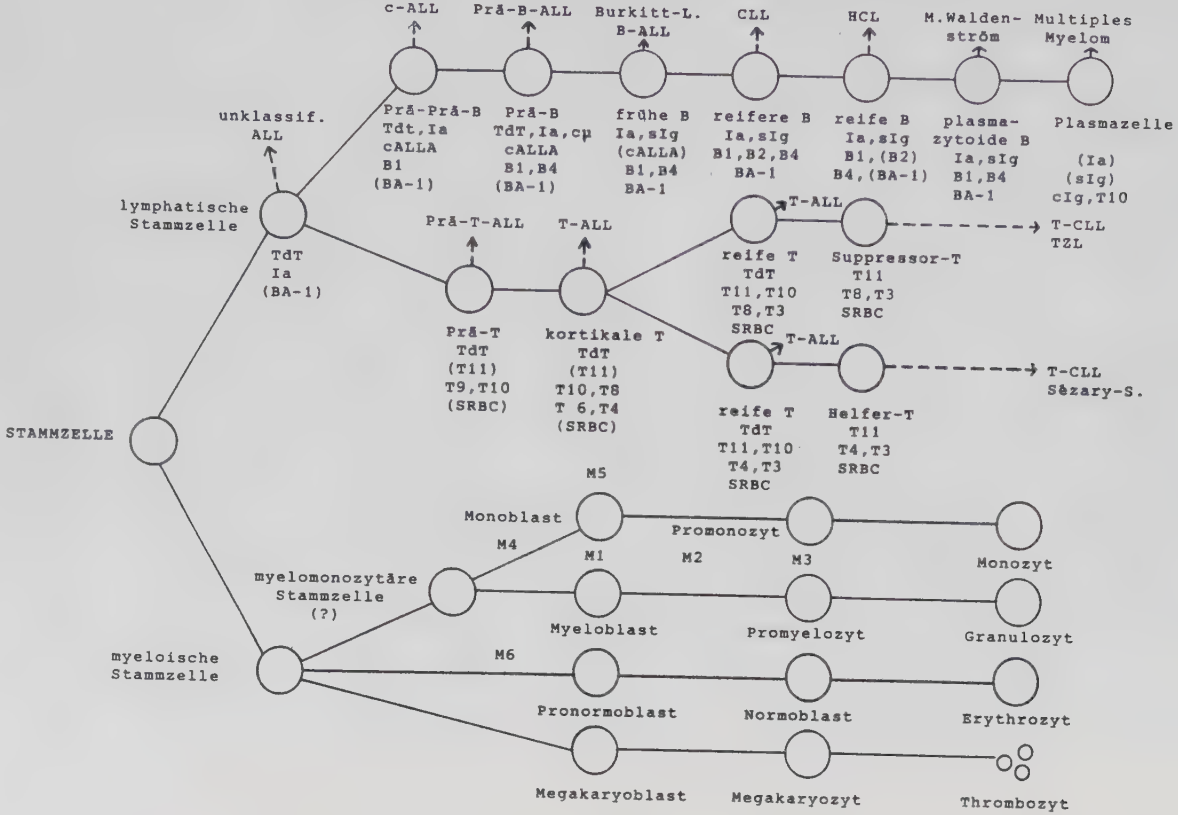
Die Entwicklung der myeloischen Zellen erfolgt beim Erwachsenen im Knochenmark, sie führt zu differenzierten Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten (siehe Abb. 2). Monozyten, phylogenetisch die ältesten Abwehrzellen in Vertebraten, entstehen aus sich schnell teilenden mesodermalen Vorläufern, den Promonozyten. Ob diese von frühen Zellen in der Granulozytenreihe oder von Stammzellen abstammen, ist ungeklärt. Knochenmarks-Monozyten reifen und werden für eine Zeitlang in die Zirkulation entlassen, ehe sie ins Gewebe einwandern.

Die morphologischen Untergruppen der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) werden gewöhnlich durch den im PB und KM dominierenden Zelltyp definiert. Die meisten AML-Subgruppen (evtl. mit Ausnahme der Erythroleukämie, M6) haben Ia-Antigene und reagieren mit My7; die myelomonozytären und monozytären Subgruppen (M4, M5) reagieren mit OKM1. Allen diesen Zellen fehlen c-ALL, B1, B2 und BA-1 Antigene. Diese Phänotypen sind in den meisten Fällen identisch mit den entsprechenden normalen, nicht malignen Zellen (57).

Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) ist im frühen Krankheitsstadium die Kontrolle der Proliferation der myeloischen Zelle defekt, Differenzierung findet statt; später verliert die CML-Zelle die Fähigkeit zur Enddifferenzierung, was zur Blastenkrise führt.

Tumorzellen lassen sich charakterisieren durch das Fehlen von oder durch fehlende Reaktion auf Faktoren, die das Wachstum normaler Zellen kontrollieren. Die meisten Tumoren zeigen chromosomale Abnormalitäten, v.a. in fortgeschrittenen Stadien. Während die übrigen Körperzellen normalerweise nicht betroffen sind, besitzen in einem gegebenen Tumor alle neoplastischen Zellen häufig dieselbe oder eine ähnliche zytogenetische Veränderung. Zwischen unterschiedlichen Tumoren sind die chromosomalen Veränderungen häufig unterschiedlich, aber sie stellen keine zufälligen Muster dar. - Die zytogenetischen Befunde weisen darauf hin, daß somatische Genveränderungen für die Tumorgenese wichtig sind, und daß die meisten Neoplasmen von einer Zelle abstammen. Eventuell ermöglicht der Karyotypwechsel der betreffenden Zelle einen Wachstumsvorteil und eine Expansion als neoplastischer Klon (139). - Es wird vermutet,

Abb.2 Schematische Darstellung der Entwicklung der lymphatischen und myeloischen Zellen und ihre Beziehung zu Leukämien*



Legende zu Abb.2

T3,4,6,8,9,10,11: OKT-Antikörper
HCL : Haarzell-Leukämie;TZL: T-Zell-Lymphom
cμ : intrazytoplasmatisches IgM; sIg:Oberflächen-Ig
cIg : intrazytoplasmatisches Ig,schwere und leichte Kette
TdT : terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
( ) : Ag teilweise exprimiert

Einteilung der AML nach der French-American-British (FAB) Nomenklatur:
M1: undifferenziert myeloisch;M2: myeloisch
M3: progranulozytär ;M4: myelomonozytär
M5: monozytär ;M6: erythroleukämisch

*aus: Foon,K. et.al.(1982),Blood 60,1

daß diese nicht-zufälligen chromosomalen Veränderungen an für die Karzinogenese wichtigen Genorten liegen und daß sie aufzeigen, in welcher Form die Funktion dieser „Onkogene" verändert werden kann (101).

1.4. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Interferonproduktion in Lymphozytenkulturen von gesunden Personen und von Tumorpatienten untersucht werden; dabei war die IFN-Produktion in Beziehung zu setzen zu der Bildung von Interleukin-2, einem ebenfalls wichtigen immunregulatorischen Molekül, und zur Proliferation. Vor der Untersuchung von Patienten sollten die verwendeten Testsysteme mit Blut von Kontrollspendern etabliert werden.
Die Induktion von Interferon ist in Antigen- und Mitogen-stimulierten Systemen möglich.
Zunächst sollte die autolog und allogen induzierte IFN-Produktion in der Gemischten Lymphozytenkultur (MLC) untersucht und geprüft werden, ob und inwieweit sich Differenzen in den MHC-Antigenen der Stimulatorzellen auf die Interferonbildung auswirken.

Im nächsten Teil dieser Arbeit war die IFN-Produktion mit Mitogenen zu stimulieren und ein Testsystem zu erstellen, mit dessen Hilfe Interferonbildung und zelluläres Wachstum schnell, einfach und unter Beibehaltung der physiologischen Zellzusammensetzung bestimmt werden können. Dabei war auf die Anwendbarkeit in klinischen Situationen, v.a. auch bei Tumorpatienten, Rücksicht zu nehmen.

Der 3. Teil der Arbeit sollte die in vitro-IFN-Produktion durch periphere Blut- und Knochenmarkzellen von Patienten mit malignen Erkrankungen auf möglicherweise vorhandene Defekte hin untersuchen. Die zu testenden Personenkollektive waren

- Patienten mit soliden Tumoren
- Patienten mit nicht-leukämischen hämatologischen Systemerkrankungen wie Morbus Waldenström und Plasmozytom
- Patienten mit lymphatischen oder myeloischen Leukämien

Es stellte sich folgende Frage: ist die IFN-Produktion durch periphere Blutlymphozyten verändert, auch wenn das periphere Blut (wie bei Patienten mit M. Waldenström und Plasmozytom) frei von Tumorzellen ist?

Im letzten Teil der Arbeit war Blut und Knochenmark von gesunden Individuen und von Tumorpatienten mittels Schafserythrozyten und/oder monoklonalen Antikörpern in Subpopulationen aufzutrennen. Es sollte versucht werden, den Phänotyp und den Differenzierungsgrad der Interferon-bildenden Zellen zu bestimmen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. (Bio-)Chemikalien, Lösungen, Medien und Arbeitsgeräte

Alle nicht aufgeführten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad "pro analysi" und wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.
Spezielle Produkte stammten von folgenden Firmen:

Methyl-^{3}H-Thymidin (2Ci/mmol)	Amersham Buchler,Braunschweig
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Apotheke der Klin. Univ.-Anst. Erlg.
Falconröhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
96 well-Flachboden-Mikrotiterplatten	- " -
Neuraminidase	Behringwerke AG, Marburg
RPMI-1640	Biochrom KG, Berlin
Fötales Kälberserum	- " -
Lymphokult T (natürliches Il-2)	Biotest Pharma GmbH, Frankfurt
Ziege anti-Maus Antikörper ($F(ab')_2$-Fragment, IgA+G+M, FITC-markiert)	Cappel Lab., vertrieben durch Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf
24 well-Kulturplatten	Costar, vertrieben durch Technomara, Fernwald
Gewebekulturflaschen	- " -
Medium 199 (M199)	Flow Laboratories Ltd., Irvine, USA
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	- " -
Penicillin/Streptomycin	Gibco Bio-Cult, Karlsruhe
Hepes	- " -
Minimal Essential Medium (MEM)	- " -
Basal Medium Eagle (BME)	- " -
RPMI-1640 (für die MLC)	- " -
TdT (Terminale Desoxynukleotidyl-transferase	- " -
Rinderblut (defibriniert)	Gesellschaft für Mikrobiologische Nährmedien mbH (GMN),Essen

96 well-Rund- und Spitzboden-Mikrotiterplatten	Greiner & Söhne, Nürtingen
humanes rekombinates IFN-α_2	La Roche, Basel, Schweiz
Aqualuma Plus (Szintillationsflüssigkeit)	Lumac, B.V., Holland
Pokeweed Mitogen (PWM, aus Phytolacca americana, Kermesbeere)	Medac, Hamburg
Schafblut (defibriniert)	Medizinische Mikrobiologie, Universität Erlangen
Interferonstandard	National Institute of Health
Hu IFN-α(Ga 23-902-530)	(NIH), Bethesda, USA
Hu IFN-β(G-023-902-527)	- " -
Hu IFN-γ(G-023-901-527)	- " -
Lymphoprep (Ficollmedium)	Nyegaard & Co, Oslo, Norwegen
humanes IFN-γ(Nr.14-121-3200)	Paesel GmbH & Co, Frankfurt
Kaninchen AK gegen humanes IFN-α, -β, -γ	- " -
Staphylococcus aureus Protein A	Pharmacia, Freiburg
Vetren 200 (Heparin-Natrium)	Promonta GmbH, Hamburg
Acridinorange	Serva Feinbiochemica,Heidelberg
Concanavalin A (ConA, aus Canavalia ensiformes, Schwertbohne)	- " -
Mitomycin C	- " -
Trypanblau	- " -
2-Mercaptoäthanol	- " -
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen bei München
Rinderserumalbumin (BSA)	- " -
Natrium-Butyrat	- " -
12-O-Tetradekanylphorbol-13-acetat (TPA)	- " -
Glasfiberfilterpapier	Skatron, Lierbyen, Norwegen
Phytohämagglutinin (PHA, aus Phaseolus vulgaris, Gartenbohne)	Wellcome Reagents, Beckenham, England
Szintillationsröhrchen (6ml)	Zinsser, Frankfurt

Humanes AB-Serum stammte jeweils von 4-5 Blutspendern:
das Blut wurde 20 Minuten bei 1700 g zentrifugiert, das Serum 30 Min. bei 56°C inaktiviert, gepoolt und portionsweise bei -20°C eingefroren.

Für die Klassifizierung der malignen Erkrankungen und für die Trennung von mononukleären Zellpopulationen wurden verschiedene monoklonale Antikörper verwendet. Die AK stammten aus der Maus, ihre Charakterisierung und Spezifität ist aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1 Monoklonale Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	MG des erkannten Ag's [D]	Ig-Klasse	Bezugsquelle	Literatur
OKT3	reife T-Lymphozyten (mitogen)	19.000	IgG-2a	Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan, N.Y.,USA	163
LEU 4		20.000	IgG-1	Becton-Dickinson, Heidelberg	150
OKT4	reife T-Helfer/Inducer-Zellen	62.000	IgG-2b	Ortho (s.o.)	163
OKT6	Thymozyten	49.000	IgG-1	Ortho (s.o.)	163
OKT8	reife T-Suppressor-/Zytotoxische Zellen	76.000	IgG-2a	Ortho (s.o.)	161,163
OKT9	frühe hämatopoetische Zellen, proliferierende u. aktivierte Zellen, Transferrin-Rezeptor	190.000	IgG-1	Ortho (s.o.)	181
OKT10	aktivierte Zellen unterschiedlicher Linien, Plasmazellen	37.000	IgG-1	Ortho (s.o.)	162
OKT11	T-Lymphozyten, Thymozyten (SRBC-Rezeptor)	50.000	IgG-2a	Ortho (s.o.)	163
3A-1	Thymozyten, T-Inducer-Zellen, ConA-Suppressor T-Zellen	40.000	IgG-1	Dr.A.Fauci	69
Leu-9	T-Lymphozyten, Nullzellen	40.000	IgG-2a	Becton-Dickinson (s.o.)	117
Leu-7 (HNK-1)	Nullzellen, Natural Killerzellen, Large Granular Lymphocytes	110.000	IgM	Becton-Dickinson (s.o.)	108
B1	reife B-Lymphozyten und Vorstufen	35.000	IgG-2a	Coulter, Krefeld	20
B2	B-Lymphozyten	120.000 140.000	IgG-2b	Coulter (s.o.)	134
B4	B-Zellen aus lymphoiden Organen, 5% der KM-Zellen	40.000 80.000	IgG-1	Coulter (s.o.)	135
BA-1	B-Lymphozyten, Prä-B-Zellen, keine Plasmazellen, Granulozyten (Bcell associated antigen)	30.000	IgM	Hybritech Inc. San Diego, USA	112
BA-2	Lymphoide Vorläuferzellen (Leukemia associated antigen p24)	24.000	IgG-3	Hybritech. (s.o.)	112
OKIa-1	B-Zellen, Monozyten, aktivierte T-Zellen (HLA-DR Determinante)	29.000 34.000	IgG-2	Ortho (s.o.)	160
J5(cALLA)	c-All-Antigen: c-All Blasten, prä-B-ALL, Granulozyten	100.000	IgG-2a	NEN (New England Nuclear), Boston,USA	164
OKM1	Monozyten, Nullzellen, einige Granulozyten und myeloische Vorläuferzellen	170.000	IgG-2b	Ortho (s.o.)	30,189
U28	frühe myeloische Zellen (FAB M1, M5), Granulozyten	n.d.	n.d.	Dr.R.Winchester	43
Leu M1	frühe myeloische Zellen (FAB M2, M3), Granulozyten	n.d.	IgM	Becton-Dickinson (s.o.)	68
My-7	Monozyten (FAB M1-M5) Granulozyten	150.000	IgG-1	Coulter (s.o.)	189

Lösungen und Medien

Alle Grundmedien und Zusatzmedien wurden steril bezogen oder durch geeignete Methoden keimfrei gemacht.

Acridinorangelösung

Acridinorange	0,5	mg
PBS	ad 100	ml, filtrieren

Ammoniumchloridlösung

NH_4Cl	0,83	g
Aqua bidest.	ad 100	ml

Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	8	g
KCl	0,2	g
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	1,15	g
KH_2PO_4	0,2	g
Aqua bidest.	ad 100	ml, pH 7,3 - 7,4 einstellen

PBS - BSA

BSA	10	g
NaN_3	0,2	g
PBS	ad 1000	ml

PBS-Glyzerin

Glyzerin	50	ml
NaN_3	0,02	g
PBS	ad 100	ml

Trypanblaulösung

Trypanblau	0,1	g
PBS	ad 100	ml, filtrieren

Zellkulturmedium

L-Glutamin 200 mM	10 ml
Penicillin/Streptomycin 10^4IE/ml	5 ml
Hepes 1,5 M	5 ml
FCS oder ABS	50 ml
RPMI-1640, M199 od. DMEM	500 ml

Arbeitsgeräte

- Brutschränke 5060 EK / CO_2	Heraeus, Hanau
- Titertek-Cellharvester	Skatron, Lierbyen, Norwegen
- Szintillationszähler 1218 Rackbeta	LKB-Wallac, Turku, Finnland
- Mikroskope 4777767 und III RS, 466249-9903 mit d. Filter FT 520 - 560	Zeiss, Oberkochen
- Zentrifugen Roto Silenta/K	Hettich, Tuttlingen
- Zellsorter Epics V	Coulter Electronics, Hialeah, USA
- Einfrierautomat Cryoson BV-6, Mikroprozessor-gesteuert	Cryoson Deutschland GmbH, Schöllkrippen

2.2. Testpersonen

Wenn nicht extra vermerkt, wurden in jedem Fall Blutspender ausgeschlossen, die unter Therapie mit das Immunsystem beeinflussenden Medikamenten (u.a. Cordicosteroide) standen. Die untersuchten Patienten wurden, wenn nicht anders vermerkt, in der Medizinischen und Chirurgischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg behandelt.

Patienten mit Morbus Hodgkin (n=5)

5 Frauen im Alter von 30 - 56 Jahren (mittleres Alter 40 Jahre) in den klinischen Stadien: II A, III A, III B (je 1 Patientin) und IV B (2 Patientinnen). Alle Personen waren bei Blutentnahme bereits mit Cytostatika/Bestrahlung behandelt.

Patienten mit Primär Chronischer Polyarthritis (n=7)

6 Frauen und 1 Mann im Alter von 33 bis 72 Jahren (mittleres Alter 52 Jahre).

Patienten mit dem AIDS-Related Complex (Pre-AIDS, n=10)

10 Patienten (anonym), die im Landesinstitut für Tropenmedizin in Berlin bei Prof. U. Bienzle behandelt wurden.

Patienten mit soliden Tumoren (n=15)

- 10 Patienten mit Colorektalen Tumoren (4 Rektum-, 3 Colon-, 3 Sigma-Ca), darunter 3 Frauen im Alter von 61-63 Jahren (mittleres Alter 62 Jahre) und 7 Männer im Alter von 49-73 Jahren (mittleres Alter 58 Jahre).
  Die Tumoren waren als Adenome klassifiziert: Tumorwachstum, -ausbreitung und -histologie verteilten sich auf:
  Dukes B (1 Patient), C1 (6 Patienten), C2 (1 Patient),nicht klassifizierbar nach Dukes: 2 Patienten.
  Malignitätsgrad: 1 (2 Patienten), 2 (4 Patienten), 3 (3 Patienten), nicht zu ermitteln bei 1 Patient.
- 2 Patientinnen mit Mamma-Ca (mittleres Alter 61 Jahre),

- 1 Patient mit Ca unklarer Organherkunft im Hals-Lymphknoten (64 Jahre),
- 1 Patient mit Myxolymphosarcom (24 Jahre),
- 1 Patient mit einem einherdigen Plasmozytom (76 Jahre).

Patienten mit Plasmozytom (n=5)

Dabei handelt es sich um eine maligne IgG-, A- oder D-Paraproteinämie: 3 Frauen zwischen 66 und 75 Jahren (mittleres Alter 71 Jahre) und 2 Männer mit 69 und 78 Jahren. 2 Patienten hatten IgA-, 3 Patienten hatten IgG-Paraprotein.

Patienten mit Morbus Waldenström (n=4)

Dabei handelt es sich um eine maligne IgM-Paraproteinämie: 2 Frauen (79 und 85 Jahre) und 2 Männer (39 und 81 Jahre).

Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen vom B-Zell-Typ (n=2)

1 Patientin (49 Jahre) und ein Patient (56 Jahre).

Patienten mit Lymphatischen Leukämien (n=17)

Die Klassifizierung der Leukämien erfolgte durch histologische,zytologische und immunologische Untersuchungsmethoden:

- 3 Jungen mit T-ALL im Alter von 10 bis 15 Jahren (mittleres Alter 12 Jahre),
- 8 Patienten mit c-ALL (3 Frauen und 5 Männer im Alter von 3 bis 44 Jahren, mittleres Alter 17 Jahre),
- 1 Patient mit T-CLL (15 Jahre),
- 1 Patient mit einem Sézary-Syndrom (76 Jahre),
- 3 Patienten mit B-CLL (2 Frauen und ein Mann im Alter von 64 bis 73 Jahren, mittleres Alter 68 Jahre),
- 1 Patient mit einer Plasmazell-Leukämie (80 Jahre).

Patienten mit Myeloischen Leukämien (n=16)

- 12 Patienten mit AML (4 Frauen und 8 Männer im Alter von 16 bis 79 Jahren, mittleres Alter 51 Jahre),

- 4 Patienten mit CML (1 Frau und 3 Männer im Alter von 52 bis 75 Jahren, mittleres Alter 63 Jahre), davon befanden sich 2 Personen in einer Blastenkrise.

Sonstige Patienten

1 Patient (69 Jahre) mit einem Thymom bei Myasthenia gravis.

Als Vergleichspersonen dienten eine Patientin (59 Jahre) mit einer benignen IgG Paraproteinämie und 90 freiwillige Blutspender (51 Frauen und 39 Männer) zwischen 12 und 62 Jahren, deren mittleres Alter bei 28 Jahren lag.

Gesundes Knochenmark stammte von 10 Patienten (4 Frauen mit mittlerem Alter von 45 Jahren und 6 Männer mit mittlerem Alter von 56 Jahren), die wegen des Verdachts auf eine maligne Erkrankung am Beckenkamm punktiert worden waren und bei denen sich der Verdacht nach eingehender klinischer Untersuchung als unbegründet erwies.

2.3. Zellseparation aus peripherem Blut und Knochenmark

2.3.1. Isolierung und Kryopräservierung von Lymphozyten

Die Isolation von Lymphozyten erfolgte über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten unter Verwendung eines Gemischs aus Ficoll (hochpolymerer Zucker) und Isopaque (= Röntgenkontrastmittel) mit einer bei 20°C definierten Dichte von ρ = 1,077 g/ml (Lymphoprep). Die Dichte ist somit größer als die der Lymphozyten und kleiner als die der Granulozyten und Erythrozyten (24). Jedem Patienten und Kontrollspender wurden durch Punktion einer peripheren Vene 20 - 200 ml Blut entnommen und mit 10 IE Natrium-Heparin /ml Vollblut versetzt. Knochenmark wurde aus dem Beckenkamm steril biopsiert und pro ml mit 20 IE Natrium-Heparin versetzt. Je 20 ml Blut/KM wurden in 50 ml Glasröhrchen über 15 ml Lymphoprep geschichtet. Nach einer Zentrifugation 20 Minuten bei 800 g und RT sedimentierten die Erythrozyten und polymorphkernigen Granulozyten auf dem Boden des Röhrchens, während die mononukleären Zellen und Thrombozyten in der Interphase zwischen Lymphoprep und Plasma angereichert waren. Diese wurden abgesaugt und in 50 ml Falconröhrchen dreimal in HBSS gewaschen (Zentrifugation je 10 Minuten bei 450 g). Nach Aufnahme in Kulturmedium mit 10 % Serumanteil wurde die Zellzahl durch 1:2 Verdünnung eines Aliquots mit Trypanblau oder, bei Vorhandensein kontaminierender Erythrozyten, mit Acridinorange mikroskopisch bestimmt. Lebendige Zellen schließen den Farbstoff Trypanblau aktiv aus, während tote Zellen angefärbt werden. Acridinorange bindet an Nukleinsäuren und emmittiert Photonen bei einer Anregungsfrequenz von 450-490nm, wobei DNS gelblich-grün fluoresziert. Somit ist eine Unterscheidung zwischen kernlosen Erythrozyten, mononukleären lymphoiden Zellen und polymorphkernigen Granulozyten möglich. Die Vitalität der Zellen lag bei über 95 %, davon waren 90 - 95 % Lymphozyten und Monozyten und 5-10 % Granulozyten.

Sollten mononukleäre Zellen zwecks Austestung zu einem späteren Zeitpunkt konserviert werden, so wurden sie in flüssigem Stickstoff bei - 120°C gelagert. Dazu wurden sie auf mindestens 20 x 10^6/ml R20F$^+$ eingestellt,10 Minuten auf Eis gestellt und im Verhältnis 1:1 tropfen-

weise mit kaltem Dimethylsulfoxid (16%ig in Ro^+) versetzt. Unmittelbar anschließend wurden sie mittels eines elektronisch gesteuerten Flüssigstickstoff-Einfriergeräts in 2 ml Plastikröhrchen langsam heruntergekühlt. - Das erneute Auftauen erfolgte rasch im 37°C Wasserbad, anschließend wurde tropfenweise $RIOF^+$ zugegeben und dreimal gewaschen. Die Vitalität lag bei 90 %.

2.3.2. Entfernung adhärenter Zellen

Die hierzu angewendete Methode beruht auf der Eigenschaft myeloischer Zellen, partikuläres Eisen zu phagozytieren und an Plastik zu adhärieren. Bei der ersten Methode wurden 4 ml heparinisiertes Blut 1:10 mit Medium gemischt, 60 mg steriles Eisenpulver zugesetzt und geschüttelt. Nach 2-maliger Inkubation für 45 Minuten bei 37°C, zuerst aufrecht, dann horizontal und jeweils unter Schütteln wurden die PBL durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert (sieh 2.3.1.). Bei der zweiten Methode wurden $20x10^6$ PBL in 40ml $RIOF^+$ in einer 200 ml Gewebekulturflasche aus Plastik für eine Stunde bei 37°C horizontal inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden durch vorsichtiges Abgießen und Nachwaschen mit 40 ml Medium (37°C) entfernt. Nach Zufügen von 40 ml kaltem Medium erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden die adhärenten Zellen von der Flasche abgeschlagen. Dieser Vorgang wurde je nach Bedarf 5-6 mal wiederholt (mikroskopische Betrachtung der Flaschenwand).

2.3.3. Trennung von B- und T-Lymphozyten

Diese Trennung wurde mit 2 unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Die erste Methode basiert auf der Eigenschaft reifer T-Zellen, mit Schafserythrozyten Rosetten zu bilden (145): 20 ml frische Schafserythrozytenlösung (gepacktes Erythrozytenvolumen 2,5 - 3,5 ml) wurden dreimal in HBSS gewaschen (Zentrifugation 10 Minuten bei 1200 g), mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und mit Neuraminidase versetzt. Durch die Neuraminidasebehandlung der Schafserythrozyten erhält man eine stabilere Bindung an die T-Zellen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde zweimal mit HBSS gewaschen, und 2,5 ml gepackte Erythrozyten wurden mit

$R10F^+$ auf 50 ml aufgefüllt (5%ige Lösung). $4x10^6$PBL wurden in 10 ml $R20F^+$ in einem Glasröhrchen (Rundboden!) aufgenommen, mit 3 mal SRBC-Suspension versetzt,5 Minuten bei 37°C inkubiert und 5 Minuten bei 120g zentrifugiert. Nach 2-stündiger Inkubation auf Eis wurde der Überstand abgegossen und der Bodensatz durch horizontales Drehen um die Röhrchenachse vorsichtig resuspendiert. Nach langsamem Zufügen von 12 ml $R10F^+$ wurde die Suspension mit 15 ml Lymphoprep unterschichtet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation (10 Minuten bei 800 g) befanden sich die nicht rosettenbildenden Non T-Zellen in der Interphase, während die rosettenbildenden T-Zellen am Boden sedimentierten. Beide Zellfraktionen wurden geerntet, die in der T-Fraktion vorhandenen Erythrozyten wurden durch hypotone Lyse mit 0,83%iger NH_4Cl-Lösung (5 Minuten bei 37°C im Wasserbad) beseitigt. T- und Non-T-Zellen wurden 2-mal mit HBSS gewaschen und in serumhaltigem Medium aufgenommen. Ein vor der NH_4Cl-Lyse entnommenes Aliquot der Zellsuspension wurde mit Acridinorange versetzt, und es wurden diejenigen Lymphozyten als SRBC-Rosetten-positiv bewertet, die 3 oder mehr Erythrozyten angelagert hatten. Die Ausbeute dieser Methode lag bei 60 - 70 %, die Vitalität der Zellen war $>$ 95 %.

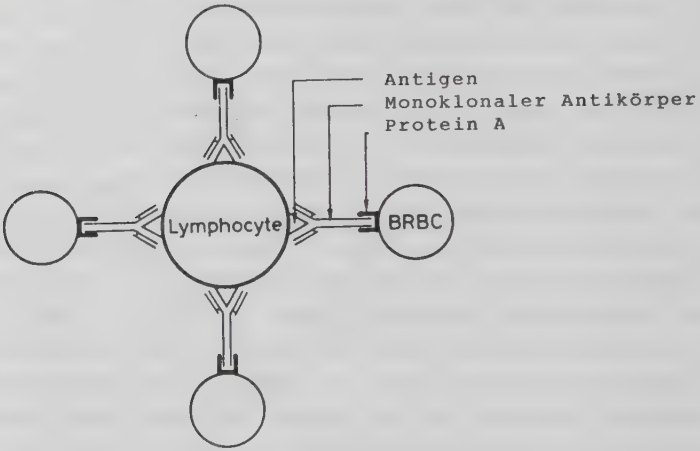
Eine zweite Methode macht sich die Adhärenz von B-Zellen und Monozyten an Nylonwolle zunutze (86): 10 ml-Spritzen wurden mit 300 mg gekochter Nylonwolle gepackt, gassterilisiert und, mit 20 ml warmem $R5F^+$ gefüllt, 1 h bei 37°C inkubiert. $30x10^6$ PBL pro Nylonwollsäule wurden 1 h bei 37°C inkubiert, die nichtadhärenten Zellen daraufhin mit warmem (37°C) $R10F^+$ eluiert und die adhärenten Monozyten und B-Zellen mit kaltem (4°C) $R10F^+$ herausgewaschen. Die Ausbeute dieser Methode war ca. 60 %, die Vitalität lag gleichbleibend bei 95 %.

2.3.4. Trennung von Zell-Subpopulationen

Subpopulationen von mononukleären Zellen lassen sich durch Rosettierung mit Protein A-beschichteten Rindererythrozyten trennen, wenn die Lymphozyten zuvor mit einem geeigneten monoklonalen Antikörper inkubiert wurden (48 ; 154 ; Abb. 3). Protein A (SPA) ist ein Protein aus der Zellwand von Staphylococcus aureus und besitzt hochaffine Bindungsstellen für den Fc-Teil von IgG, bei murinen Immunglobulinen v.a. für IgG 2a, 2b und 3. Jedes SPA-Molekül kann 2 Moleküle IgG binden.

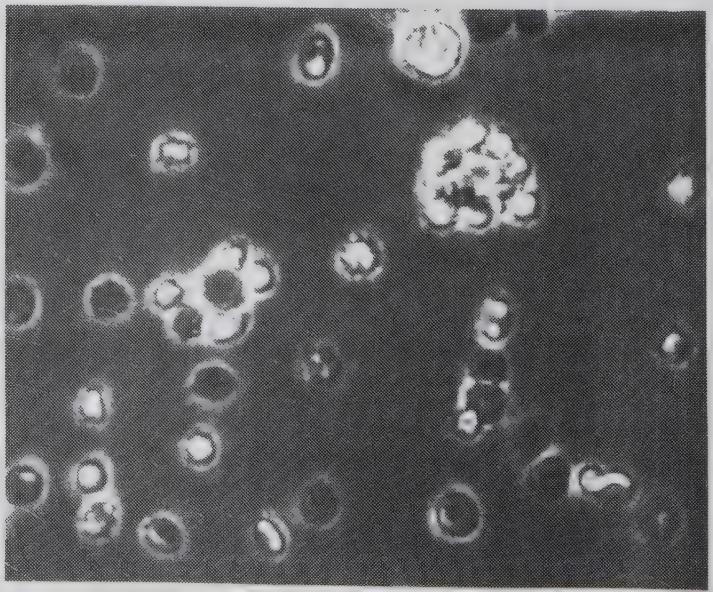
Defibriniertes Rinderblut (gepacktes BRBC Volumen 1-2 ml) wurde 3-mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (Zentrifugation 10 Minuten bei 1200 g),mit SPA (0,5 mg in 1 ml NaCl) und $CrCl_3$ (0,75 mg in 1 ml NaCl, frisch angesetzt) zusammengegeben und 5 Minuten geschüttelt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde 3-mal gewaschen, und 1 ml gepackte BRBC wurde mit $R10F^+$ auf 50 ml aufgefüllt (2%ige Suspension).
Die Lymphozyten wurden mit dem gegen die zu trennende Subpopulation gerichteten monoklonalen AK gemischt (200-400 µl AK auf $100x10^6$ Zellen), 40 Minuten bei RT inkubiert, 3-mal in HBSS mit 3 % FCS gewaschen und auf $8x10^6$/ml $R10F^+$ in Rundbodenröhrchen eingestellt. - Nach Zugabe von 1 ml 2%iger BRBC-Lösung pro ml Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 120 g zentrifugiert, 35 Minuten bei RT zwecks Rosettierung inkubiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Zugabe des Überstands wurde im Dichtegradienten zentrifugiert (20 Min. bei 800 g); die Antikörper-positive, rosettierte Zellpopulation befand sich jetzt im Pellet, während sich die nicht-rosettierten Zellen in der Interphase angesammelt hatten. Beide Fraktionen wurden geerntet, die Erythrozyten mit NH_4Cl lysiert, die Zellen gewaschen und in serumhaltigem Medium aufgenommen. Die Qualität der Rosettierung wurde vor der Ammoniumchlorid-Lyse durch Entnahme eines Aliquots und Betrachtung der mit Acridinorange angefärbten rosettierten Lymphozyten überprüft. Die Zellausbeute dieser Methode lag bei 40 %.

Abb.3a Schematische Darstellung der Trennung von Zell-Subpopulationen mittels Rosettierung*



*aus: Baum,W.(1984),Diplomarbeit,Erlangen

Abb.3b Rosettenbildung von Lymphozyten mit Oxerythrozyten (500-fache Vergrößerung)



2.4. Analyse von Zelloberflächendeterminanten

Die Klassifizierung von Subpopulationen mononukleärer Zellen und Granulozyten erfolgte mittels monoklonaler Antikörper (siehe Tab. 1). Dafür wurden $3x10^5$ Zellen pro Kavität in Spitzboden-Mikrotiterplatten mit je 5 µl murinem AK gemischt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS-BSA (Zentrifugation 3 Minuten bei 400 g) wurden 5 µl FITC-markierten Ziege anti-Maus Antikörpers ($F(ab')_2$-Fragment, Verdünnung 1:5 in PBS-BSA) zugesetzt,erneut 30 Minuten inkubiert und 3-mal gewaschen. Das im PBS-BSA enthaltene Natriumazid bewirkte eine Herabsetzung des Zellstoffwechsels zur Vermeidung des sogenannten „Cappings", d.h. der Polarisierung der mit AK beladenen Age auf der Zellmembran. Nach Zugabe von 3µl PBS-Glyzerin pro Kavität wurden die Zellsuspensionen auf Objektträger gegeben, und es wurde der fluoreszierende Anteil von 100 ausgezählten Zellen im Phasenkontrast-Mikroskop unter UV-Licht bei einer 400-1000-fachen Vergrößerung bestimmt. Die AK-positiven Zellen reflektieren blaues Licht der Wellenlänge 488 nm grün und erscheinen mit einem leuchtenden Zellsaum. Tote Zellen können aufgrund ihres diffus angefärbten Zytoplasmas ausgeschlossen werden. - In manchen Fällen wurde parallel zur mikroskopischen Auswertung eine Analyse mit dem Zellsorter EPICS (= electronical programmable individual cell sorter) durchgeführt. Für diese Fluoreszenzanalyse wurden die wie oben beschrieben gefärbten Zellen in 300 µl PBS-BSA aufgenommen, und von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Zellen ausgewertet. Im Sorter passieren die zu untersuchenden Zellen einzeln einen Laserstrahl einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei werden über einen Streulichtdetektor Zellgröße und über einen zweiten Detektor Fluoreszenzintensität registriert. Die in wenigen Fällen erfolgte HLA-Typisierung der Lymphozyten wurde gemäß der konventionellen NIH- (National Institute of Health, Bethesda, USA) Methode mit einem Komplement-abhängigen Mikrozytotoxizitätstest in 2 Schritten bei RT durchgeführt. Mit Lymphoprep getrennte und durch Nylonwolle fraktionierte T- und B-Zellen dienten als Targetzellen. Ihre Typisierung erfolgte mit einem Panel von Antiseren mit Spezifität für HLA-A, B, C, DR, MT oder MB Antigene gemäß der Definition auf dem 8. Histokompatibilitätsworkshop (186).

2.5. Stimulation von Lymphozyten zur Proliferation

Die Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten kann unter Verwendung allogener Stimuli in der gemischten Lymphozytenkultur oder, nach Stimulation mit Mitogenen, im Lymphozytentransformationstest untersucht werden.

2.5.1. Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

$1x10^5$ PBL (Responderzellen) wurden durch die gleiche Anzahl autologer oder allogener Zellen (Stimulatorzellen) zum Wachstum angeregt.Die DNS-Synthese der Stimulatorzellen wurde zuvor durch eine Behandlung mit Mitomycin C (25 µg pro $1-5x10^6$ Zellen pro ml RO^+ für 30 Minuten bei 37°C) oder durch Röntgen-Bestrahlung mit 40 - 60 Grey blockiert. Nach Kultur in jeweils 175 µl (Triplikate) für 7 Tage bei 37°C und 7 % CO_2 in Rundboden-Mikrotiterplatten erfolgte die Bestimmung der Proliferation durch Messung der DNS-Syntheserate: 18 h vor Testende wurden die Kulturen mit 1 µCi ^{3}H-Thymidin markiert und anschließend entweder bei - 20°C eingefroren oder sofort mit einem Titertek-Zellharvester durch Lyse mit Aqua dest. auf Glasfiberfilterpapier geerntet. Die Zellkerne einer Kultur wurden mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, und die aufgenommene Radioaktivität wurde mit einem Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse werden in Zerfällen pro Min. (dpm) ausgedrückt.

2.5.2. Lymphozytentransformationstest (LTT)

150 µl Lymphozytensuspension ($5x10^4$ oder $1x10^5$ Zellen in $R10F^+$ oder $M10AB^+$) wurden zusammen mit 25 µl Mitogen in Triplikaten in Rundboden-Mikrotiterplatten für 3-4 Tage bei 37°C und 7 % CO_2 kultiviert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte wie bei der MLC durch ^{3}H-TdR-Einbau in die zelluläre DNS, allerdings nur für 6 h. Die verwendeten T-Zell-Mitogene waren Phytohämagglutinin (PHA, 1 und 5 µg/ml), Concanavalin A (ConA, 10 und 12,5 µg/ml), Pokeweed Mitogen (PWM, 0,5; 1 und 10 µg/ml) und die monoklonalen AK Leu-4 und OKT 3 (Verdünnung je-

weils 1:350). Eingesetzt wurde auch Interleukin 2 (Lymphokult T, Verdünnung 1:7) und Tetradekanylphorbolacetet (TPA, 7 ng/ml) in Verbindung mit PHA 1 µg/ml. Ferner wurde MAS, ein Protein mit MG von 13.000 d, gewonnen aus Kulturüberständen von Mycoplasma arthritidis, welches mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, als Stimulans eingesetzt. Die Anreicherung des Proteins (durch Dr. Nicklas am Zentralen Tierlabor, DKFZ, Heidelberg) erfolgte folgendermaßen:der Mycoplasma-Kultur-Überstand wurde 1 h bei 20.000 g zentrifugiert, hitzedestabilisiert, anschließend durch einen Seitz-Filter gegeben und portionsweise bei - 70°C eingefroren.

Zur Messung der mitogeninduzierten Proliferation in kleinen Blutproben und in einem System mit natürlicher Verteilung der Zellpopulationen wurde ein Vollbluttest weiterentwickelt und erweitert, der von Kirchner (94) für die Interferonproduktion eingesetzt wird.

2.5.3. Vollbluttest (VBT)

Heparinisiertes Blut (10 IE Na-Heparin/ml Vollblut) von Kontrollspendern bzw. Patienten wurde 1:10 oder 1:15 mit M199 gemischt. In manchen Experimenten wurde das Blut 4-mal mit HBSS gewaschen und die Zellen anschließend in M199 mit Zusatz von autologem oder allogenem humanen ABS aufgenommen. 150 µl der Blut-Medium-Mischung wurden in Triplikaten in Rundboden-Mikrotiterplatten gegeben und zusammen mit 25 µl Mitogen 3 Tage lang bei 37°C 7 % CO_2 und 93 % O_2 inkubiert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte wie bei MLC und LTT durch ^{3}H-TdR-Markierung während der letzten 6 oder 18 h der Kultur. Zur Ermöglichung eines Vergleichs mit dem LTT wurde die in den Vollblutkulturen vorhandene Lymphozytenzahl mit Hilfe von am Versuchstag erstellten Differentialblutbildern ermittelt.

2.6. Stimulation von Lymphozyten zur Lymphokinproduktion

2.6.1. Interferonproduktion

Die Testansätze zur Produktion von IFN in der MLC, dem LTT und VBT waren identisch mit den Proliferationsansätzen und wurden in zur gleichen Zeit angelegten Mikrotiterplatten durchgeführt. 3-4 Tage (LTT und VBT) bzw. 7 Tage (MLC) nach Versuchsbeginn wurden die Platten für 5 Minuten bei 260 g zentrifugiert; der IFN-haltige zellfreie Überstand wurde in eine neue Platte pipettiert und bis zur IFN-Messung bei - 20°C gelagert.

2.6.2. Interleukin 2-Produktion

Die IL 2-Produktion wurde sowohl mit isolierten Lymphozyten im LTT als auch mit 1:10 verdünntem heparinisierten Vollblut im VBT durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden in 2 ml Endvolumen entweder $2x10^6$ Lymphozyten oder 1714 µl Vollblut (1:10 verdünnt) in 24 well-Platten zusammen mit 286 µl Mitogen angesetzt (die Mitogenkonzentrationen sind aus 2.5.2. zu ersehen). Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 7 % CO_2 wurden die Kulturüberstände geerntet und bis zur Austestung ihrer IL 2-Aktivität bei - 20°C gelagert. - Für das Wachstum von kultivierten T-Zellen (siehe unter 2.8.1.)wurde IL 2-haltiges Medium in größeren Mengen benötigt. Zu dessen Herstellung wurden PBL auf $1x10^6$/ml $R2F^+$ in 500 ml-Kulturflaschen unter Zugabe von 0,5 µg/ml PHA eingestellt. Bei einigen Ansätzen wurde zusätzlich zu PHA mit Feeder Cells (lymphoblastoiden Zellinien) stimuliert, da diese eine weitere Stimulation zur Interleukin 2-Produktion bewirken können (63). Nach 48 Stunden wurde der Überstand zellfrei geerntet, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und bei - 20°C aufbewahrt.

2.7. Interferonbestimmung in Zellkulturüberständen

Die Messung des Interferons im Zellkulturüberstand wurde von Frau R. Augustin in der Arbeitsgruppe Kirchner am DKFZ in Heidelberg durchgeführt.

2.7.1. Quantitativer Nachweis mittels der CPE-Inhibitionsmethode (49)

In 96 well-Flachbodenplatten wurden humane Fibroblastenzellen (HEp-2, $4x10^4$/well) in penicillin-komplettiertem Minimal Essential Medium mit 10 % FCS angelegt. Nach Kultivierung über 2-3 Tage bei 37°C und 5 % CO_2 hatte sich ein konfluenter Monolayer gebildet, und es wurden 50 µl der auszutestenden Überstände in je 6 Verdünnungsstufen einer 3-er Verdünnungsreihe (1:3, 1:9 etc. bis 1:729) aufgetragen. Den Standard stellten humanes, rekombinantes IFN-α_2 und IFN-γ dar, Zellkontrolle (ohne Virus) und Viruskontrolle (ohne IFN-Überstand) wurden mitgeführt. Nach eintägiger Inkubation wurde der Überstand verworfen, die Zellen 2-mal mit HBSS gewaschen und mit 200 µl Vesikulärem Stomatitis Virus(VSV, in Basal Medium Eagle mit 2 % FCS) mit der Multiplizität von 1 infiziert. Nach weiterer Inkubation für mindestens 24 h (abhängig vom Zustand der Viruskontrolle) wurden die Überstände verworfen, die Zellrasen mit 3%iger Formalinlösung fixiert, gewaschen, mit 1%iger Kristallviolettlösung gefärbt, erneut gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde aufgrund des vorhandenen cytopathischen Effekts der Interferon-Titer bestimmt; dieser wurde gebildet aus dem reziproken Wert der größten Probenverdünnung, die die Anzahl der Virus-Plaques um 50 % reduzierte. Eine Laboreinheit IFN entsprach ca. 3 internationalen Einheiten (I.E.).

2.7.2. Qualitativer Nachweis

Das in den Kulturüberständen enthaltene IFN wurde zum einen auf Säurestabilität getestet: nach 24 h Dialyse gegen 1 N HCl (pH2) bzw. gegen Medium im Kontrollansatz wurden die Proben durch Zugabe von 1 N NaOH

(pH 7,4; 1h bei 4°C) neutralisiert, und die verbliebene IFN-Aktivität wurde bestimmt (siehe unter 2.7.1.). - Zum andern wurde der Interferon-Subtyp durch Neutralisationstests bestimmt: gleiche Volumina von Überstand und Antikörpern gegen humanes IFN-α, β und γ (Verdünnung 1:10) wurden 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend dem IFN-Assay unterzogen (siehe unter 2.7.1.).

2.8. Interleukin 2-Bestimmung in Zellkulturüberständen

Auch die Messung von IL-2 erfolgte in einem biologischen Test: dabei wurden als Indikatorzellen kultivierte T-Zellen (CTC) verwendet.

2.8.1. Herstellung von kultivierten T-Zellen

100-200x10^6 PBL eines gesunden Spenders wurden auf 1x10^6/ml R10F$^+$ eingestellt und unter Zusatz von 0,5 µg/ml PHA 7-10d bei 37°C und 7 % CO_2kultiviert. Während dieser Zeit wurde 2-mal mit R10F$^+$, welches 20 % IL-2 enthielt, gefüttert. Das hierfür eingesetzte IL-2 wurde entweder, wie unter 2.6.2. beschrieben, selbst hergestellt oder käuflich erworben. Die CTC wurden zur späteren Verwendung in Aliquots elektronisch kontrolliert eingefroren und in Flüssigstickstoff kryopräserviert (siehe unter 2.3.1.).

2.8.2. Quantitativer Nachweis von Interleukin-2

Je 100 µl der zu testenden Überstände wurden in 4 Verdünnungsstufen einer 3-er Verdünnungsreihe (konzentriert, 1:3, 1:9, 1:27; in Ro$^+$) in Triplikaten in 96-well Flachbodenplatten überführt. Zu jeder Kavität wurden 100 µl einer Suspension von CTC (1x10^6/ml R20F$^+$) zugesetzt, sodaß sich als Endkonzentrationen der Überstände die Titerstufen 1:2, 1:6, 1:18 und 1:54 ergaben. Mitgeführt wurden Zellkontrolle und der Interleukin 2-Standard F1-2-8, der freundlicherweise von Dr. D.M. Strong,

Naval Medical Research Institute, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt wurde. Nach 3-tägiger Inkubation bei 37°C und 7 % CO_2 erfolgte die Bestimmung der Proliferation durch radioaktive Markierung der CTC mit ^{3}H-TdR während der letzten 4 h der Kultur. Anschließend wurde geharvestet und die Radioaktivität im Betaflüssigkeitszintillationszähler bestimmt. Aus den Ergebnissen der Triplikate (in dpm) wurde der Mittelwert gebildet, zum Vergleich der Resultate aus verschiedenen Tests wurde die IL 2-Aktivität der Kulturüberstände jeweils als Prozentsatz des mitgeführten IL 2-Standards angegeben.

2.9. Darstellungsweise der Ergebnisse und statistische Auswertung

Aus den Einzelbefunden wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und der Vergleich der Mittelwerte gegebenenfalls nach dem U-Test von Mann und Whitney (32) vorgenommen. Die Abbildungen zeigen in Blockdiagrammen Mittelwerte bzw. Mediane und Standardabweichungen, in Kurven wegen der besseren Übersichtlichkeit meist nur Mittelwerte. - Die Proliferationsergebnisse (Prolif.) werden in Zerfällen pro Minute (disintegrations per minute, dpm), die Interferontiter (IFN) in Einheiten und der Interleukin 2 (IL-2) - Gehalt in Prozent vom Tageswert des IL 2-Standards angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Interferonproduktion und Lymphoproliferation in der Gemischten Lymphozytenkultur (MLC)

Die Fragestellung zu Beginn der Arbeit beinhaltete die Interferon-γ-Produktion in der humanen MLC, ihre eventuell vorhandene Abhängigkeit von Differenzen im MHC-Bereich der Blutspender und ihre mögliche Beeinflußbarkeit durch leukämische oder aus Tumoren stammende Stimulatorzellen.
Als erstes wurde versucht, die Versuchsbedingungen in der MLC zu optimieren.

3.1.1. Inhibition der Stimulatorzellen

Die Hemmung der DNS- bzw. Proteinsynthese peripherer Blutlymphozyten durch Bestrahlung und Mitomycinbehandlung wurden zuerst mittels Einbau von ^{75}Selen-markiertem Methionin verglichen. Dabei war die inhibierende Wirkung der Bestrahlung mit 40 - 60 Grey der von Mitomycin gleichzusetzen. In einem in einer unilateralen MLC durchgeführten Vergleich erwiesen sich Röntgenstrahlen vorteilhafter als Mitomycin, da sie sowohl die Lymphoproliferation als auch die Interferonproduktion in stärkerem Maße unterbanden. In den weiteren unilateralen MLC's wurden die Stimulatorzellen mit 40-60 Grey bestrahlt, d.h. nur die Responderzellen waren zur Proliferation und Lymphokinproduktion in der Lage.

3.1.2. Einfluß unterschiedlicher Kulturmedien auf die MLC

Die Zellkulturmedien RPMI-1640 (Gibco), Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) und M199 wurden jeweils unter Zusatz von 2,5 oder 10 % humanem gepoolten AB-Serum in der bilateralen MLC mit PBL von 6 Spendern verglichen. Die Versuchsansätze mit M199 und 2-5 % ABS erbrachten sowohl in der autologen als auch in der allogenen MLC die größte Lympho-

proliferation und IFN-Produktion. Die geringste Proliferation ergab sich bei Verwendung von RPMI-1640, die niedrigste IFN-Produktion mit DMEM.

Bei einem Vergleich von M199 mit RPMI-1640 (Biochrom), jeweils mit 10 % Serumzusatz, in der unilateralen MLC von 4 Spendern zeigte sich eine bessere Proliferation bei Verwendung von RPMI-1640 im Vergleich zu M199. Die Interferonproduktion war dagegen in Kulturen mit M199 stark erhöht im Vergleich zu RPMI (siehe Tab. 2). In den weiteren MLC's wurde zur Erreichung maximaler IFN-Titer M199-Medium verwendet. - Der Zusatz von 2-Mercaptoäthanol ($5x10^{-5}$M) zum Kulturmedium bewirkte weder eine Erhöhung der Proliferation noch der IFN-Produktion in der humanen MLC. Dies steht im Gegensatz zu Berichten über die murine MLC.

Tab. 2 Einfluß unterschiedlicher Kulturmedien auf die unilaterale MLC

System			d7		d8		d9	
			RPMI	M199	RPMI	M199	RPMI	M199
autolog	Prolif.	$\bar{X}$	23.000	13.000	26.000	20.000	22.000	33.000
		S	24.000	13.000	17.000	21.000	16.000	31.000
	IFN	$\bar{X}$	0	2	0	4	0	7
		S	0	4	0	3	0	5
allogen	Prolif.	$\bar{X}$	252.000	68.000	172.000	77.000	110.000	57.000
		S	60.000	29.000	36.000	38.000	25.000	25.000
	IFN	$\bar{X}$	7	132	2	66	3	71
		S	5	72	2	38	2	40

Legende:
Kontrollspender : n = 4
Stimulatorzellen bestrahlt mit 40 Gy
Medienzusatz : 10 % ABS

3.1.3. Zeitkinetiken in der MLC

Unter Verwendung von M199 plus 10 % ABS wurden mit insgesamt 11 Kontrollspendern Kinetiken von Tag 1-10 durchgeführt, sowohl in der bila-

teralen als auch in der unilateralen MLC. Dabei lag im allogenen System die maximale Proliferation an Tag 8 und der maximale IFN-Titer an Tag 7. Im autologen System war die höchste Proliferation an Tag 8 - 9, die höchsten IFN-Werte an den Tagen 7 - 9 zu sehen (Tab. 3).

Generell konnte sowohl in der allogenen als auch in der autologen gemischten Lymphozytenkultur eine gute Proliferation induziert werden, höhere Interferontiter wurden in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (118) jedoch nur durch allogene Stimulation erreicht. - Eine Subtypenbestimmung des in der MLC induzierten IFN's zeigte das vorwiegende Vorhandensein von säurelabilem Interferon-γ: weniger als 5 % der ursprünglich vorhandenen Aktivität waren nach pH2-Behandlung noch festzustellen.

3.1.4. Einfluß von Zusätzen zu MLC

Auf unterschiedliche Weise wurde versucht, die IFN-Produktion in der (autologen) MLC zu steigern:
Eine MLC mit durch SRBC-Rosettierung isolierten und anschließend mit ConA (10 µg/ml, 3 d) transformierten peripheren T-Zellen (ConA-Blasten) und autologen oder allogenen, frisch isolierten PBT bewirkte keine Erhöhung der Lymphozytenaktivitäten im Vergleich zu den frisch angelegten gemischten Kulturen.
Die Wirkung von Mitogenzusätzen zur MLC zeigt Tabelle 4. Dargestellt sind die Daten der autologen und allogenen MLC mit 4 Kontrollspendern, dazu als Kontrolle die Resultate aus dem LTT mit dem jeweiligen Stimulans. Zieht man die nur durch mitogenen Einfluß resultierenden Werte in Betracht, so verbleiben eine geringe Verstärkung der IFN-Produktion in der autologen und allogenen MLC mit Con A und PWM und eine verständliche Verstärkung der Proliferation in der allogenen MLC mit Interleukin-2.
Der Zusatz von 4%igem Polyäthylenglykol 6000 und 2,5%igem Diäthanolaminoäthan zur MLC hatte keine steigernde Wirkung. Auch in der sekundären MLC, d.h. nach Zugabe von frisch isolierten B-Zellen als sekundärem Stimulans an Tag 7 einer laufenden MLC desselben Spenders, konnte die Interferonproduktion im Vergleich zur primären MLC nicht verstärkt werden.

Tab. 3 Vergleich von unilateraler und bilateraler MLC

MLC			UNILATERAL					BILATERAL				
System			d5	d6	d7	d8	d9	d5	d6	d7	d8	d9
autolog	Prolif.	$\bar{X}$	3.000	10.000	13.000	20.000	33.000	5.000	13.000	18.000	24.000	25.000
		S	3.000	10.000	12.000	20.000	31.000	3.000	9.000	7.000	20.000	16.000
	IFN	$\bar{X}$	n.d.	6	2	4	7	2	7	10	7	7
		S	n.d.	8	4	3	5	1	7	12	4	8
allogen	Prolif.	$\bar{X}$	21.000	58.000	68.000	77.000	57.000	30.000	69.000	91.000	93.000	71.000
		S	12.000	24.000	29.000	38.000	25.000	24.000	37.000	46.000	56.000	36.000
	IFN	$\bar{X}$	n.d.	100	132	66	71	62	89	144	82	74
		S	n.d.	54	72	38	40	68	70	79	62	50

Legende:

Kontrollspender : n = 4

Stimulatorzellen i.d. unilateralen MLC bestrahlt mit 40 Gy

Medium : M10AB^{+}

Tab. 4 Einfluß von Zusätzen auf die Lymphozytenaktivität in der MLC

Zusatz			LTT	MLC	
				autolog	allogen
MEDIUM	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	3.000	11.000
		S	200	3.000	6.000
	IFN	$\bar{X}$	0	3	9
		S	0	3	11
CON A	Prolif.	$\bar{X}$	158.000	167.000	140.000
		S	14.000	46.000	48.000
	IFN	$\bar{X}$	27	78	75
		S	15	45	48
PWM	Prolif.	$\bar{X}$	119.000	139.000	114.000
		S	41.000	22.000	26.000
	IFN	$\bar{X}$	105	227	146
		S	120	168	60
TPA	Prolif.	$\bar{X}$	78.000	90.000	72.000
		S	98.000	18.000	24.000
	IFN	$\bar{X}$	102	95	119
		S	43	44	33
IL-2	Prolif.	$\bar{X}$	93.000	91.000	198.000
		S	21.000	63.000	135.000
	IFN	$\bar{X}$	14	10	14
		S	4	6	2

Legende:

Kontrollspender : n = 4

MLC : Stimulatorzellen (bestrahlt mit 40 Gy) : $1x10^5$/well

Responderzellen : $1x10^5$/well

LTT : nur Responderzellen : $1x10^5$/well

Medium : $M10AB^+$

Mitogene : Con A 12,5 µg/ml; PWM 0,5 µg/ml; TPA 10 ng/ml, IL-2 30 %

Angabe der Optimalwerte von Tag 5-7.

3.1.5. Einfluß von HLA-Antigenen auf die MLC

Ein eventuell vorhandener Einfluß von Antigenen des HLA-Systems auf die IFN-Produktion in der MLC konnte nur in einer Familienstudie untersucht werden: die PBL von HLA-identischen Schwestern (Zwillingen) produzierten in der unilateralen MLC gegen sich selbst und gegeneinander kein Interferon. In der Reaktion gegen die in HLA-A,B,C und DR abweichenden Eltern und gegen zwei nicht-verwandte Spender (Unterschiede in einem Fall in HLA-A, B und DR; im anderen Fall in HLA-A, B und C) zeigten die Zwillingsschwestern eine voneinander abweichende Interferonbildung: die eine produzierte in allen Fällen zwischen 5 und 7 Einheiten IFN, während die andere in keinem Fall Interferon bildete.

In der Proliferation waren die Werte bei den Zwillingsschwestern dagegen ähnlich, d.h. gegenseitig induzierten sie kein Wachstum, während nach Stimulation durch die Lymphozyten der Eltern und nicht-verwandten Spender eine vergleichbare Proliferation gemessen wurde.

Die bis hierher erreichten Ergebnisse deuteten daraufhin, daß das Testsystem der humanen gemischten Lymphozytenkultur zur Abklärung der Frage nach der Beeinflußbarkeit der Interferonproduktion nicht geeignet war: vor allem in der autologen MLC resultierten zu geringe IFN-Titer, um Differenzen aufzuzeigen; außerdem schwankten die Titer der unterschiedlichen Versuche sehr, was eine Standardisierung der humanen MLC zusätzlich erschwerte. - Bei der Suche nach einem anderen Testsystem, mittels dessen Unterschiede in der Interferonprodukton und in der Lymphoproliferation aufgezeigt werden können, bot sich ein Vollblut-Assay an, der bei Prof. Kirchner am DKFZ gerade für die Antigen-induzierte IFN-Produktion entwickelt wurde und der einen ausgeprägten Bezug zur in vivo-Situation besaß. Der Versuch, eine MLC im Vollblut zu etablieren, erwies sich als sehr schwierig, da einerseits aus technischen Gründen eine geringere Blutverdünnung als 1:10 nicht möglich war (beim Ernten der Kulturen mit dem Zell-Harvester resultierte Verklumpung und anschließende Überschwemmung wegen der großen Zahl an Erythrozyten/well), andererseits aber eine größere Anzahl von Lymphozyten pro Kultur zur antigenen Stimulation notwendig schien. Die in der Vollblut-MLC maximal erreichte Proliferation war 10.000 dpm, der höchste IFN-Titer 5 Einheiten, beides gemessen am Tag 7 einer bilateralen MLC mit je 90 µl Vollblut (1:10) von Stimulator und Responder und angesetzt in 96 well-Rundbodenplatten.

Auch der Ansatz größerer Volumina in 24 well-Platten oder in 15 ml Röhrchen führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.
Daraufhin wurde von der MLC als Testsystem abgegangen und die mitogeninduzierte Lymphoproliferation im Vollblut parallel zur Interferonproduktion etabliert, standardisiert und verglichen mit dem herkömmlichen Lymphozytentransformationstest, bei dem isolierte periphere Blutlymphozyten eingesetzt werden. Auch die mitogeninduzierte Interleukin 2-Produktion konnte im Vollbluttest etabliert und verglichen werden mit der IL 2-Produktion durch isolierte PBL.

3.2. Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Lymphoproliferation im Vollbluttest (VBT) und Lymphozytentransformationstest (LTT)

3.2.1. Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen

Der Erfolg des VBT war in hohem Maß abhängig von den Kulturbedingungen: als geeignet erwiesen sich feuchte Brutschränke mit einem konstanten CO_2-Gehalt von 7 %, ferner die Verwendung von Rundbodenplatten der Fa. Greiner. Proliferations- und IFN-Bestimmungen wurden stets in direkt untereinanderliegenden Kavitäten durchgeführt, um identische Kulturbedingungen zu gewährleisten. Auch eine Messung beider Parameter in denselben Kavitäten war möglich, wurde aber nach Austestung unterlassen: durch Zugabe von frischem Kulturmedium zu den wells, nachdem der IFN-haltige Überstand zellfrei abgesaugt worden war, zeigte ein Teil der daraufhin für 6 h radioaktiv-markierten Zellkulturen ein besseres Wachstum (evtl. aufgrund des nährstoffreichen Mediums), der andere Teil eine schlechtere Proliferation (evtl. wegen ungenügender Möglichkeit zur Konditionierung des Mediums) als Zellkulturen, die während der gesamten Kulturdauer keinen Mediumwechsel erfahren hatten.

Die heparinisierten Blutproben wurden für den Einsatz im VB-Assay 1:10 oder stärker verdünnt, eine geringere Verdünnung bewirkte eine Aggregation der Erythrozyten und eine Überschwemmung beim Harvesten der Kulturen. Als Verdünnungsmedien erwiesen sich M199 und M10AB$^+$ gleichermaßen praktikabel: Interferonproduktion und Proliferation lagen bei beiden Medien in gleicher Höhe, ein zusätzliches Serumangebot zum autologen Plasma war offenbar im VBT nicht notwendig. Bei der Untersuchung der

Frage, ob sich das in den Kulturen per se vorhandene autologe Plasma oder, nach Waschgängen, hinzugefügtes allogenes Serum günstiger auf VBT und LTT auswirkt, resultierten aus den autologes Plasma enthaltenen natürlich belassenen Vollblutkulturen höhere IFN-Titer und höhere Proliferation, während im LTT der Einsatz von autologem und allogenem Serum ähnliche Ergebnisse bewirkte (Tabelle 5a). Um die Testbedingungen für beide Serumzusätze im Vollbluttest anzugleichen, wurden daraufhin die VB-Proben auch vor Zugabe des autologen Serums gewaschen. Wie aus Tab. 5b hervorgeht, war die Proliferation deutlich erhöht bei Zusatz von autologem Serum nach Waschen der Zellen, während die Interferonproduktion im autologen Plasma ohne Waschen höher (mit PHA) oder unter allen Serumbedingungen ähnlich war. Eventuell war bei den Waschgängen ein hemmender Faktor entfernt oder die Lymphozyten durch diese Prozedur zur Proliferation stimuliert worden. - In den folgenden Experimenten wurden die VB-Kulturen in autologem Plasma kultiviert, während im LTT gepooltes allogenes AB-Serum eingesetzt wurde.

Untersuchungen über die Auswirkungen unterschiedlicher Zellzahlen pro Mikrokultur konnten im VB-Assay wegen oben beschriebener technischer Schwierigkeiten bei Einsatz höherer Konzentrationen nicht durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen im LTT, dargestellt in Abb. 4, zeigen bei einer Spanne von $2{,}5 \times 10^4$ bis 4×10^5 PBL/well ein Maximum von Proliferation und IFN-Gehalt bei Einsatz von 2×10^5 PBL/well. Bei Vorhandensein von genügend Zellmaterial ist der Einsatz von 2×10^5 PBL/Kultur dem von weniger Zellen vorzuziehen. Höchste IFN-Titer wurden mit PWM, die größte Proliferation mit PHA erzielt.

Die Resultate der LTT-Zeitkinetiken von Tag 1-8 mit 6 Kontrollspendern zeigt Abb. 5: höchste IFN-Titer wurden an Tag 4-5 gemessen, maximale Proliferation war an Tag 3-4 (für PHA und ConA) oder Tag 5 (für PWM) zu sehen, höchste IL 2-Titer waren an Tag 2 vorhanden. Die Kinetiken im Vollblut zeigten optimale IFN-Produktion und Proliferation an Tag 4. Auch in VB-Kulturen konnte an Tag 2 IL 2 gemessen werden, jedoch deutlich weniger als im LTT (5-25 %).In den folgenden Versuchen wurden IFN-Produktion und Proliferation im VBT und LTT an Tag 3-4, IL 2-Produktion an Tag 2 bestimmt.

Tab. 5 Einfluß unterschiedlicher Seren auf VBT und LTT

5a

Serum			VBT		LTT	
Mitogen			autolog	allogen	autolog	allogen
PHA	Prolif.	$\bar{X}$	41.000	27.000	14.000	20.000
		S	40.000	13.000	15.000	30.000
	IFN	$\bar{X}$	99	29	4	5
		S	36	29	3	6
CON A	Prolif.	$\bar{X}$	11.000	9.000	3.000	3.000
		S	7.000	8.000	3.000	5.000
	IFN	$\bar{X}$	56	20	1	0
		S	39	23	2	0

5b

Serum			VBT		
Mitogen			autolog	autolog (gewaschen)	allogen
PHA	Prolif.	$\bar{X}$	28.000	50.000	37.000
		S	8.000	15.000	18.000
	IFN	$\bar{X}$	59	30	10
		S	37	15	4
CON A	Prolif.	$\bar{X}$	9.000	28.000	24.000
		S	2.000	10.000	13.000
	IFN	$\bar{X}$	8	12	14
		S	8	5	7

Legende:

Kontrollspender: n = 6 (5a); n = 3 (5b)

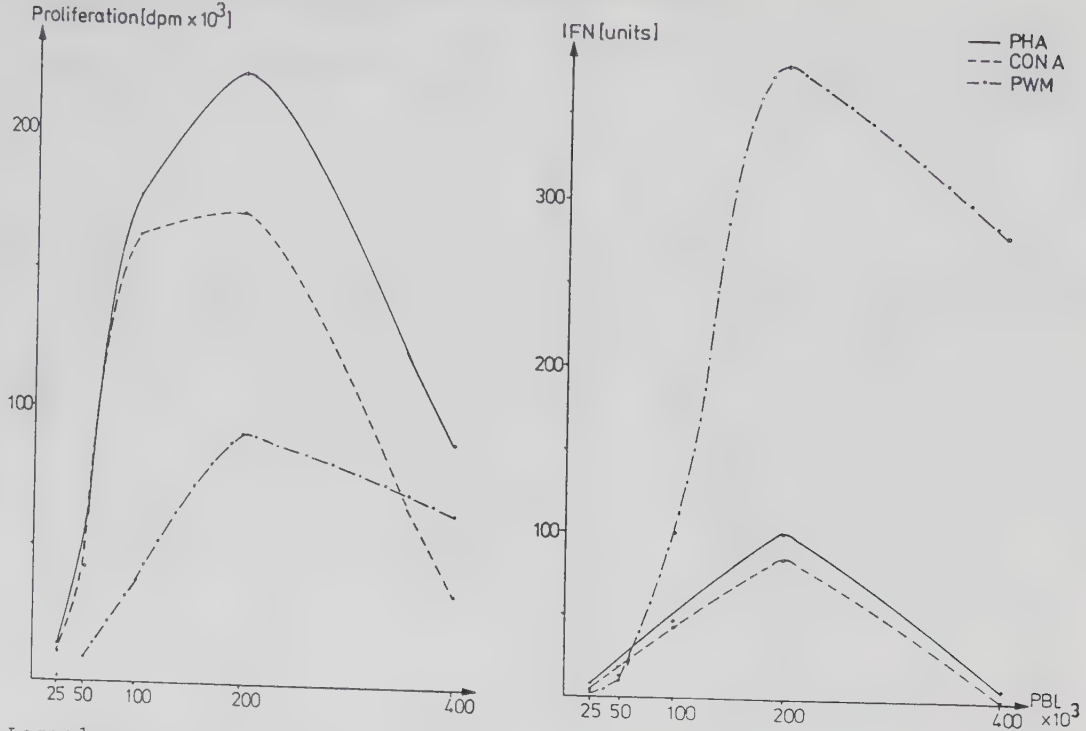
VBT : Verdünnung 1:10 mit M199

LTT : $2{,}5 \times 10^4$ PBL/well in M10AB$^+$

Kulturdauer : Proliferation 4d, IFN-Produktion 3d

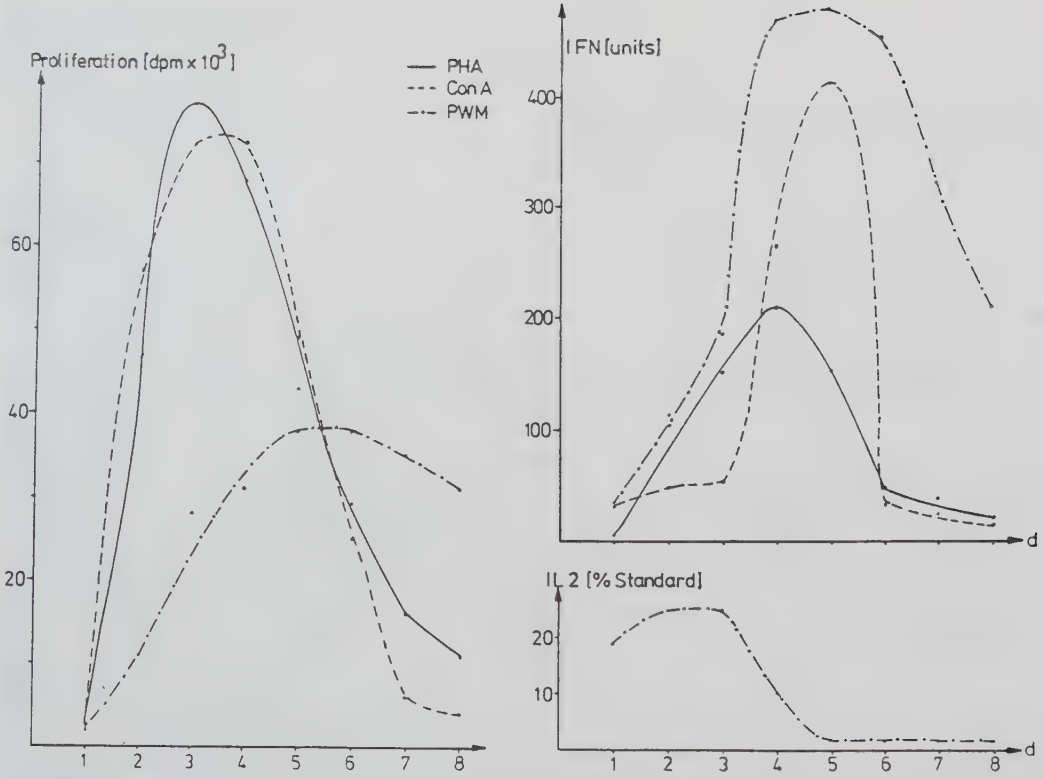
Mitogene : PHA 5 µg/ml, ConA 10 µg/ml

Abb. 4 LTT mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen



Legende
Kontrollspender: n=2
Kulturdauer : 3 Tage
Medium : M10AB$^+$
Mitogene : PHA 5ug/ml, ConA und PWM 10ug/ml

Abb. 5 Zeitkinetik im LTT



Legende
Kontrollspender: n=6
Zellzahl : $1x10^5$ PBL/well in M10AB$^+$
Mitogene : PHA 1ug/ml, ConA 10ug/ml, PWM 0,5ug/ml

3.2.2. Aktivität kryopräservierter Lymphozyten

Aus unterschiedlichen Gründen ist es oft notwendig, Lymphozyten nach der Isolation in Flüssigstickstoff einzufrieren und die funktionellen Tests zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen. Zur besseren Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse wurden Lymphokinproduktion und Proliferation von Frischzellen und von kryopräservierten Zellen derselben Spender verglichen. Tabelle 6 zeigt, daß die wieder aufgetauten Lymphozyten in der Proliferation geringfügig, in der IFN- und IL 2-Produktion jedoch deutlich höhere Aktivitäten auswiesen als die frisch isolierten Zellen. Eine Erklärung dafür ist ein bevorzugtes Absterben von Monozyten während des Einfriervorgangs und, daraus resultierend, eventuell eine geringere Prostaglandinproduktion in den Kulturen mit aufgetauten Zellen, und dadurch die Bildung höherer Interleukin 2- und Interferontiter.

Tab. 6 Vergleich von frisch isolierten und kryopräservierten Zellpräparationen im LTT

			frisch isoliert	krypräserviert
PHA	Prolif.	$\bar{x}$	55.000	60.000
		s	2.000	6.000
	IFN	$\bar{x}$	57	122
		s	98	60
	Il-2	$\bar{x}$	4	30
		s	0,5	4
PWM	Prolif.	$\bar{x}$	18.000	20.000
		s	7.000	7.000
	IFN	$\bar{x}$	167	240
		s	84	65
	Il-2	$\bar{x}$	32	50
		s	5	13

Legende:

Kontrollspender : n = 3

Medium : $R10AB^{+}$

Mitogene : PHA 5 µg/ml, PWM 10 µg/ml

Kultur : 4d, $1x10^{5}$ PBL/well

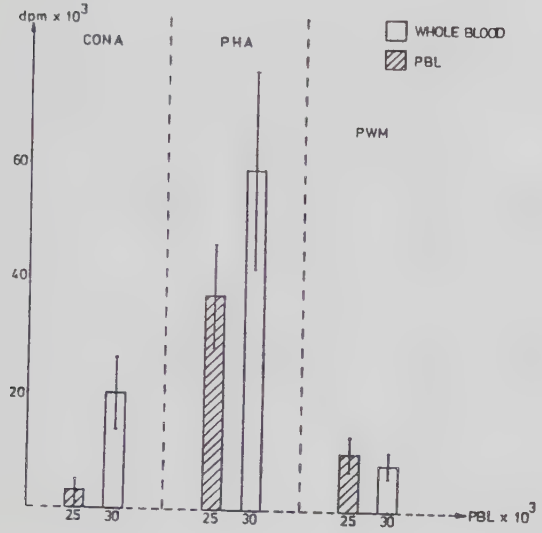
3.2.3. Vergleich von Lymphokinproduktion und Lymphoproliferation im VBT und LTT bei Kontrollspendern

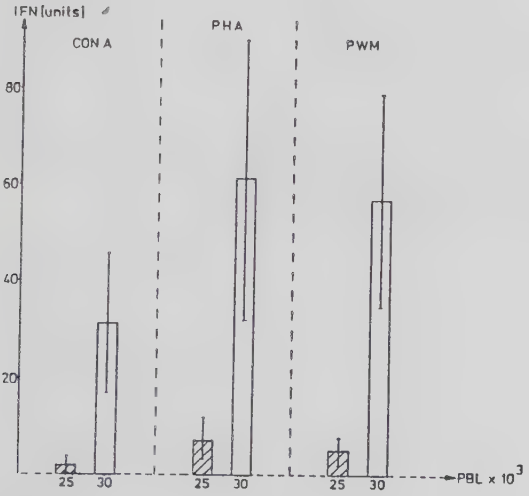
Verglichen wurde die Reaktivität auf Mitogene bei 1:10 und 1:15 verdünnten Vollblutkulturen und LTT's unter Einsatz von $2,5x10^4$, $5x10^4$ und $1x10^5$ PBL/Kultur. Mit Hilfe von Differentialblutbildern wurde die Lymphozytenanzahl pro VB-Kultur im nachhinein berechnet, und sie ergab im Mittel $2x10^4$ PBL bei der 1:15-Verdünnung und $3x10^4$ PBL bei der 1:10-Verdünnung.
Die 1:15-verdünnten VB-Kulturen resultierten in niedrigeren dpm und geringeren IFN-Titern als die 1:10-verdünnten Kulturen; bei Einsatz von $2,5x10^4$ PBL/well im LTT ergab sich eine geringere Response als mit $5x10^4$ oder $1x10^5$ PBL/well (siehe Abb. 4). Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, war die Zellproliferation in beiden Systemen nur in Antwort auf PWM vergleichbar, nach PHA- und ConA-Induktion im VB-Test dagegen signifikant erhöht ($\alpha < 0,01$ für ConA und $< 0,05$ für PHA). Die Interferonproduktion war im VBT mit allen Mitogenen 4-10-fach höher als im LTT ($\alpha < 0,01$).

Wegen der im VBT gegenüber dem LTT erhöhten Antwort wurde der Einfluß von Monozyten untersucht. Tabelle 7 zeigt, daß die Proliferation im LTT nach Depletion der Eisen-phagozytierenden Zellen um 30-70 % abnahm. Die Interferontiter reduzierten sich in den depletierten Kulturen bei Einsatz von $1x10^5$ PBL um 20-50 %, bei Einsatz von $2,5x10^4$ PBL jedoch waren sie mit und ohne Monozytendepletion ähnlich. Die im Vergleich zum Vollbluttest im LTT häufig erniedrigten Interferonwerte waren offenbar nicht auf eine verstärkt supprimierende Wirkung von im Ficoll-Gradienten angereicherten Monozyten zurückzuführen.

Bei Verwendung des monoklonalen anti-T-Zell-Antikörpers Leu 4 (siehe Tab. 1) als Mitogen zeigte nur ein Teil der Kontrollspender im Vollbluttest eine Antwort, und im LTT mit $2,5x10^4$ PBL/Kultur war gar keine Reaktion zu sehen. Diese individuelle Zellproliferation in Antwort auf Leu-4 war unabhängig von der PHA-Antwort, d.h. geringe Reaktivität auf den AK korrelierte nicht mit einer geringen Reaktion auf PHA. - Zur weiteren Untersuchung dieser Daten wurde die Antwort auf Leu-4 und auf OKT 3, einen anderen mitogenen T-Zell-AK, verglichen. Eine zunächst durchgeführte Konzentrations- und Zeitkinetik mit OKT3 zeigt Tabelle 8:

Abb.6 Mitogen-induzierte Lymphoproliferation und Interferonproduktion im VBT und LTT





Legende

Kontrollspender: n=18; Kulturdauer: 3 Tage
VBT : Verdünnung 1:10 mit M199 ($\hat{=}3 \times 10^4$ PBL)
LTT : $2{,}5 \times 10^4$ PBL/well in M10AB$^+$
Mitogene : PHA 5µg/ml, ConA und PWM 10µg/ml
Ergebnisse in : Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Tab. 7 Einfluß von Monozyten auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenantwort

			VBT	LTT $1x10^5$		LTT $2,5x10^4$	
				+ M Ø	- M Ø	+ M Ø	- M Ø
PHA	Prolif.	$\bar{X}$	57.000	184.000	129.000	49.000	39.000
		S	26.000	28.000	47.000	13.000	11.000
	IFN	$\bar{X}$	109	24	19	8	10
		S	62	6	2	3	4
CON A	Prolif.	$\bar{X}$	17.000	37.000	12.000	4.000	2.000
		S	9.000	14.000	700	2.000	800
	IFN	$\bar{X}$	17	11	7	3	3
		S	10	2	3	3	3
PWM	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	23.000	15.000	4.000	3.000
		S	600	10.000	8.000	800	1.000
	IFN	$\bar{X}$	24	23	12	5	3
		S	12	6	2	1	3

Legende:

Kontrollspender : n = 3

Kultur : IFN d3, Prolif. d4

VBT : Verdünnung 1:10 mit M199

LTT : $2,5x10^4$ und $1x10^5$ PBL/well in M10AB$^+$

Mitogene : PHA 5 µg/ml; ConA und PWM 10 µg/ml

Depletion der Monozyten (MØ) durch Eisenphagozytose.

Tab. 8 Konzentrations- und Zeitkinetik mit OKT3 im LTT

				d2	d3	d4	d5
PHA		Prolif.	$\bar{X}$	38.000	70.000	71.000	54.000
			S	4.000	11.000	7.000	11.000
		IFN	$\bar{X}$	149	174	343	300
			S	94	119	334	140
OKT 3	1:175	Prolif.	$\bar{X}$	5.000	10.000	11.000	16.000
			S	2.000	3.000	4.000	3.000
		IFN	$\bar{X}$	23	23	27	21
			S	17	16	13	10
	1:350	Prolif.	$\bar{X}$	5.000	12.000	14.000	20.000
			S	2.000	3.000	1.000	4.000
		IFN	$\bar{X}$	24	25	28	15
			S	16	15	14	2
	1:700	Prolif.	$\bar{X}$	7.000	13.000	16.000	26.000
			S	4.000	4.000	4.000	5.000
		IFN	$\bar{X}$	24	17	23	15
			S	19	1	7	3
	1:1400	Prolif.	$\bar{X}$	6.000	14.000	24.000	34.000
			S	2.000	3.000	2.000	10.000
		IFN	$\bar{X}$	18	24	26	28
			S	9	5	17	12
	1:2800	Prolif.	$\bar{X}$	8.000	21.000	27.000	28.000
			S	900	2.000	2.000	5.000
		IFN	$\bar{X}$	23	76	51	62
			S	6	47	32	17

Legende:

Kontrollspender : n = 3

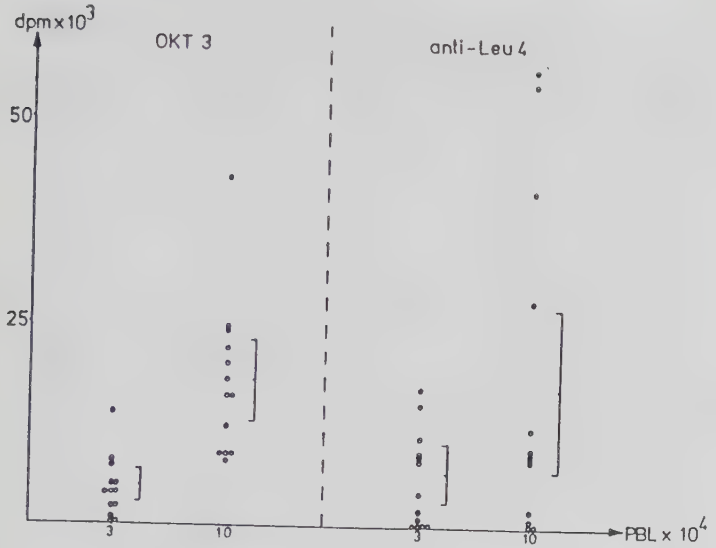
Zellzahl : 1×10^5/well in R10F$^+$

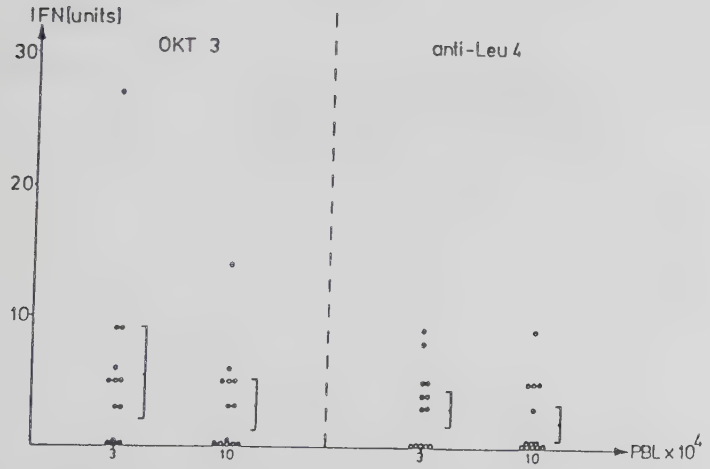
PHA : 1 µg/ml

die OKT3-Verdünnung 1:1400 und 1:2800 waren ausreichend für die Stimulation im LTT; da in den Vollblutkulturen jedoch bei einem Teil der Blutspender höhere OKT3-Konzentrationen für die Stimulation erforderlich waren, wurden die AK bei dem parallelen Einsatz von OKT3 und Leu-4 in beiden Testsystemen 1:350 verdünnt. Die Kulturdauer wurde auf 4 Tage festgelegt; im LTT wurden $1x10^5$ PBL/Kultur eingesetzt, um auch dort eine Reaktion zu erhalten.

Wie aus Abbildung 7 zu ersehen ist, proliferierten 40 % der 13 Kontrollspender im VB-Test sehr schwach, d.h. mit < $3x10^3$ dpm auf beide Antikörper hin; im LTT zeigten alle Spender eine höhere Proliferation auf OKT3, aber nur ein Teil antwortete auf Leu-4. Bezüglich der IFN-Produktion fehlte bei 50-70 % der Kontrollpersonen in beiden Testsystemen jegliche Antwort auf OKT3 und Leu-4, Proliferation und IFN-Bildung gingen häufig nicht parallel. Die individuelle Reaktivität auf die AK wurde an mehreren Personen in einem Zeitraum von 10 Monaten mehrfach getestet und erwies sich als reproduzierbar: ein „High Responder" auf den entsprechenden AK blieb ein solcher, und Umgekehrtes galt für „Low Responder". Die Analyse der Oberflächenantigene zeigte bei den getesteten Personen ähnliche Prozentsätze von OKT3- und Leu-4-positiven T-Subpopulationen und bot keine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Antwort der Lymphozyten auf beide AK. Ebenfalls war keine Korrelation für High- bzw. Low Responder mit HLA-Haplotypen herzustellen, wie sich beim Vergleich der Haplotypen HLA-identischer Geschwister, aber auch von nicht verwandten Kontrollspendern zeigte.
Der Einsatz von MAS, einem Protein aus dem Überstand von Mycoplasma arthritidis-Kulturen, zur Interferon- und Proliferationsinduktion erwies sich nur im LTT als erfolgreich, und zwar an Tag 4 mit der Verdünnung 1:35 bis 1:70 (siehe Tabelle 9).
Im Vollbluttest dagegen zeigte MAS keine mitogenen Eigenschaften. Gereinigte Überstände anderer Mycoplasma-Kulturen, z.B. von M. arginini, hatten auch im LTT keine mitogenen Fähigkeiten. Eine Korrelation der Reaktion auf MAS mit dem MHC der Blutspender war nicht festzustellen.

Abb.7 Lymphoproliferation und Interferonproduktion in Antwort auf T-Zell-Antikörper im VBT und LTT





Legende

Kontrollspender	:	n=13
VBT	:	Verdünnung 1:10 mit M199 ($\hat{=}3x10^4$ PBL/well)
LTT	:	$1x10^5$ PBL/well in M10AB$^+$
Antikörper	:	Verdünnung 1:350
Kulturdauer	:	3 Tage

Tab. 9 Konzentrations- und Zeitkinetik mit MAS im LTT

				d1	d2	d3	d4
PHA		Prolif.	$\bar{X}$	1.008	31.000	109.000	201.000
			S	500	28.000	51.000	55.000
		IFN	$\bar{X}$	67	189	146	368
			S	65	93	98	119
MAS	1:35	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	4.000	5.000	20.000
			S	1.000	4.000	4.000	20.000
		IFN	$\bar{X}$	8	15	33	105
			S	8	5	41	119
	1:70	Prolif.	$\bar{X}$	500	1.000	5.000	18.000
			S	100	1.000	4.000	20.000
		IFN	$\bar{X}$	4	9	30	105
			S	3	10	44	118
	1:105	Prolif.	$\bar{X}$	1.000	1.000	3.000	9.000
			S	1.000	1.000	2.000	7.000
		IFN	$\bar{X}$	2	31	9	6
			S	2	51	9	8

Legende:

Kontrollspender : n = 3

Zellzahl : $1x10^5$/well in $RlOF^+$

PHA : 0,5 µg/ml

MAS : Mycoplasma arthritidis supernatant

Das im Vollbluttest mitogeninduzierte IFN wurde mittels Säurebehandlung und Antisera gegen humane Interferone auf seinen Subtyp hin untersucht. Wie das im LTT gebildete Interferon erwies es sich hauptsächlich als IFN-γ: Antiserum gegen humanes IFN-γ oder pH2-Behandlung mit HCl reduzierten die IFN-Aktivität auf 0 % bzw. 3 % der ursprünglich vorhandenen Titer (Tabelle 10).

Tab. 10 Qualitative Interferonanalyse im VBT und LTT

System	IFN-Induzent	Zugabe von				
		Medium	anti-IFN-α	anti-IFN-β	anti-IFN-γ	HCl
VBT	PHA	50	50	42	0	3
	Leu-4	6	6	6	0	0
LTT	PHA	40	34	17	2	0

Legende:

IFN in Einheiten

Getestete Überstände : aus VB-Kulturen (Verdünnung 1:10)
aus LTT-Kulturen ($5x10^4$ PBL/well)

IFN-Induktoren : PHA (1 µg/ml), Leu-4 (1:350)

Eine mögliche Steigerung der mitogeninduzierten Lymphozytenreaktion, v.a. der Interferonbildung, durch Zusätze wie IL-2 oder den Tumorpromoter Tetradekanylphorbolacetat (TPA) wurde am Beispiel von PHA untersucht: bei alleinigem Einsatz von natürlichem IL-2 in den Verdünnungen 1:3,5 bis 1:28 zur Stimulation erwies sich die Verdünnung 1:7 als geeignet; gab man zusätzlich 1 µg/ml PHA, so wurden sowohl die Interferonproduktion als auch die Proliferation gesteigert, und das Maximum verlagerte sich von Tag 4 auf Tag 3. TPA (7 ng/ml) allein induzierte kein Interferon und nur eine geringe Proliferation, in Verbindung mit PHA jedoch zeigten sich an Tag 4 maximale, vorher nie erreichte Interferon-Titer und auch Proliferationswerte (Tabelle 11). Der Einsatz von Buttersäure (Natriumbutyrat 1 und 5mM) zur Lymphozytenstimulation in einer Kinetik von Tag 1-4 mit 3 Kontrollspendern bewirkte in keinem Fall eine IFN-Produktion oder Lymphoproliferation.

Tab. 11 Steigerung der mitogeninduzierten Lymphoproliferation und Lymphokinproduktion durch Zusätze

			d1	d2	d3	d4
PHA	Prolif.	$\bar{X}$	4.000	50.000	80.000	87.000
		S	2.000	31.000	47.000	39.000
	IFN	$\bar{X}$	176	300	490	405
		S	213	377	243	280
	Il-2	$\bar{X}$	-	7	-	-
		S	-	3	-	-
TPA	Prolif.	$\bar{X}$	3.000	6.000	10.000	13.000
		S	800	3.000	2.000	2.000
	IFN	$\bar{X}$	0	0	0	0
		S	0	0	0	0
	Il-2	$\bar{X}$	-	55	-	-
		S	-	2	-	-
Il-2	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	11.000	35.000	69.000
		S	500	5.000	19.000	33.000
	IFN	$\bar{X}$	300	135	355	615
		S	370	100	320	200
	Il-2	$\bar{X}$	-	65	-	-
		S	-	4	-	-
TPA+ PHA	Prolif.	$\bar{X}$	4.000	52.000	85.000	150.000
		S	100	16.000	36.000	15.000
	IFN	$\bar{X}$	120	500	700	> 729
		S	40	120	310	200
	Il-2	$\bar{X}$	-	90	-	-
		S	-	9	-	-
Il-2+ PHA	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	62.000	132.000	108.000
		S	600	39.000	85.000	43.000
	IFN	$\bar{X}$	243	294	653	729
		S	0	185	132	120

Legende:

Kontrollspender : n = 3

Zellzahl : 1×10^5 PBL/well in $RIOF^+$

Mitogene : PHA (1 µg/ml); Il-2 (Biotest, 1:7); TPA (7 ng/ml)

Proliferation in dpm, IFN in Einheiten, Il-2 in % vom Standard.

3.2.4. Anwendung des Vollbluttests bei Patienten und Vergleich mit dem LTT

Die Anwendbarkeit und praktische Bedeutung des Vollbluttests in der Klinik wurde an 5 sehr unterschiedlichen Patientengruppen untersucht: an Patienten mit Morbus Hodgkin, mit Plasmozytom, mit Tumoren des Kolorektums, mit Primär Chronischer Polyarthritis (PCP) und mit Pre-AIDS (ARC = AIDS-Related Complex). Tabelle 12 zeigt, daß bei den Patienten wie bei den Kontrollspendern im VBT eine niedrigere Proliferation resultierte als im LTT. Die Hodgkin-Patienten waren als einzige Gruppe durch Zytostatika immunsupprimiert und zeigten fast kein Lymphozytenwachstum. Die bei den Patienten gemessenen Interferontiter waren in beiden Testsystemen ähnlich, in einigen Fällen waren sie in den Vollblutkulturen erhöht im Vergleich zum LTT, was den mit gesunden Spendern erhaltenen Daten entspricht. Auffällig war die im Gegensatz zur Proliferation gute IFN-Produktion bei den Patienten mit Morbus Hodgkin. Die mitogeninduzierte Bildung von Interleukin-2, angegeben in % vom Standard, war in den Vollblutkulturen der Kontrollpersonen stark erniedrigt im Vergleich zum LTT. Zieht man jedoch die in den VB-Kulturen vorhandene Lymphozytenzahl in Betracht, die bei 6.500 Leukozyten pro µl Blut und 40 % Lymphozyten im gesamten Testansatz $4{,}7 \times 10^5$ ausmacht und damit knapp 25 % der für die IL 2-Messung eingesetzten 2×10^6 PBL beträgt, so relativieren sich die Ergebnisse.

Die stärkste IL 2-Produktion wurde im LTT mit PWM und im VBT mit PHA induziert. Bei den Patienten konnte die IL 2-Produktion nur teilweise bestimmt werden: auffällig war bei den Plasmozytompatienten die Bildung vergleichbarer Mengen IL-2 im VBT und LTT (Ausnahme: mit PWM), die zudem größer waren als bei den gesunden Kontrollen. Bei den Patienten mit kolorektalen Tumoren wurde wie bei den Kontrollspendern im VBT weniger IL-2 produziert als im LTT. Bei den untersuchten Patientenkollektiven wurde - wie beim Kontrollkollektiv - die stärkste IL 2-Produktion im LTT mit PWM und im VBT mit PHA bewirkt.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Vollbluttest sehr gut geeignet ist, um bei den unterschiedlichsten Patientengruppen die Kapazität der mitogeninduzierten/spontanen Interferon- und auch Interleukin-2-Produktion zu messen. Da sehr geringe Blutmengen (1-2 ml) für den Test ausreichend

sind und er zudem schnell und einfach zu handhaben ist, bietet der Vollbluttest die Möglichkeit, den Immun-Status auch größerer Patienten- und Kontrollkollektive zu bestimmen.

Bei den in Tab. 12 dargestellten Ergebnissen fielen bei den Patienten mit kolorektalen Tumoren und Plasmozytom im Vergleich zu den gesunden Blutspendern verringerte mitogeninduzierte Interferontiter auf. Das führte uns wieder zu der Ausgangsfrage zurück, in welchem Maße die Interferonproduktion bei Tumorpatienten abweicht oder gestört ist: gibt es eine Veränderung in der IFN-Produktion der peripheren Lymphozyten von Patienten mit soliden Tumoren oder von Lymphompatienten, bei denen bislang nur das Knochenmark befallen ist? Haben Leukämie- und Lymphomzellen selbst die Fähigkeit zur Interferonbildung? Welcher Differenzierungsgrad der (Knochenmark-) Zellen erlaubt eine Interferonproduktion, welcher Interferon-Subtyp wird hauptsächlich gebildet?

Für den Versuch, diese Fragen zu klären, wurde als Testsystem der LTT gewählt, um, bei jeweils gleichen Zellzahlen pro Kultur, einen Vergleich der unterschiedlichen Experimente zu ermöglichen. Als geeignete Kollektive zur Untersuchung boten sich Patienten mit soliden Tumoren, mit nichtleukämischen hämatologischen Systemerkrankungen und mit Leukämien an.

Tab. 12 Vergleich von VBT und LTT bei Patienten

			PHA		CON A		PWM	
			VBT	LTT	VBT	LTT	VBT	LTT
Kontrollen (n=19)	Prolif.	$\bar{X}$	19.000	57.000	7.000	16.000	2.000	16.000
		S	20.000	43.000	7.000	13.000	1.000	13.000
	IFN	$\bar{X}$	32	22	24	15	25	19
		S	42	33	40	32	34	31
	Il-2	$\bar{X}$	11	70	5	14	3	119
		S	9	52	3	12	2	80
Plasmozytom (n=4)	Prolif.	$\bar{X}$	3.000	23.000	2.000	9.000	1.000	7.000
		S	2.000	23.000	1.000	9.000	500	4.000
	IFN	$\bar{X}$	14	7	3	7	8	9
		S	18	4	4	5	7	4
	Il-2	$\bar{X}$	22	29	5	3	2	85
		S	25	32	3	1	2	24
Kolorektale Tumoren (n=9)	Prolif.	$\bar{X}$	3.000	11.000	1.000	4.000	1.000	3.000
		S	1.000	7.000	800	3.000	200	2.000
	IFN	$\bar{X}$	10	11	4	11	4	10
		S	9	11	4	17	4	9
	Il-2	$\bar{X}$	9	65	4	18	4	176
		S	9	52	4	20	3	142
Morbus Hodgkin (n=5)	Prolif.	$\bar{X}$	1.000	8.000	1.000	7.000	600	2.000
		S	800	11.000	300	8.000	600	2.000
	IFN	$\bar{X}$	25	20	18	18	9	21
		S	22	22	19	18	7	21
PCP (n=7)	Prolif.	$\bar{X}$	7.000	35.000	2.000	12.000	4.000	12.000
		S	7.000	20.000	1.000	14.000	4.000	10.000
	IFN	$\bar{X}$	9	7	3	5	4	10
		S	8	8	4	6	4	11
ARC (n=10)	Prolif.	$\bar{X}$	21.000	37.000	6.000	10.000	4.000	6.000
		S	11.000	15.000	3.000	5.000	2.000	2.000

Legende:

VBT : Verdünnung 1:10 mit M199 (≙bei Kontrollen: Prolif./IFN: $3x10^4_5$ PBL/well)
Il-2 : $5x10^5$ PBL/well)

LTT : Prolif./IFN : $5x10^4$ PBL/well in M10AB$^+$
Il-2 : $2x10^6$ PBL/well in M10AB$^+$

Mitogene : PHA, PWM: 1 µg/ml; ConA: 10 µg/ml

Proliferation (Prolif.) in dpm, IFN in Einheiten, Il-2 in % vom Standard

PCP = Primär chronische Polyarthritis; ARC = AIDS Related Complex

3.3. Interferonproduktion durch periphere Blutlymphozyten und Knochenmarkzellen; Vergleich mit der Interleukin 2-Produktion und der Proliferation

Die Fähigkeit zur spontanen und induzierten IFN-Produktion wurde im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv bei Patienten mit unterschiedlichen Tumoren und hämatologischen Erkrankungen untersucht. Tabelle 13 zeigt die Analyse der Oberflächenantigene der isolierten mononukleären Zellen und weist auf die Phänotypen der in den jeweiligen Testansätzen vorhandenen Blut- oder Knochenmarkzellen hin.

3.3.1. Untersuchung an gesunden Kontrollpersonen

Die spontan gebildeten oder mitogeninduzierten Interferontiter, die Interleukin 2-Produktion und die Proliferation durch periphere Blutlymphozyten von 65 gesunden Spendern und durch Knochenmarkzellen von 10 gesunden Personen sind in Tab. 14 dargestellt. Die IFN-Produktion und die Proliferation im Knochenmark waren teilweise höher als im peripheren Blut (nach Induktion mit PHA, TPA plus PHA und IL-2), nach Induktion mit OKT3 waren die IFN-Titer im KM niedriger als im PB. In den anderen Testansätzen waren die gemessenen Parameter im KM und PB vergleichbar. Maximale IFN- und IL 2-Titer wurden mit PWM erzielt, maximale ^{3}H-Thymidin-Einbauraten mit PHA gemessen.
Der direkte Vergleich von peripherem Blut und Knochenmark war bei einer Person möglich: sowohl die IFN-Bildung als auch die Proliferation (mit PHA, ConA, PWM und MAS) waren in diesem Fall im Knochenmark höher als im peripheren Blut.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit mononukleären Zellen von Patienten sind in Tabelle 15 dargestellt.

3.3.2. Untersuchung an Patienten mit soliden Tumoren

Bei Patienten mit soliden Tumoren (u.a. des Kolorektums und der Mamma) waren die Interferontiter generell niedriger als bei den gesunden Personen,mit PWM dabei noch am höchsten. Wie aus Tabelle 18 zu erkennen ist, war die Verminderung der IFN-Produktion außer nach Induktion mit OKT3 jedoch nicht signifikant. In Antwort auf PWM wurde mit 91 % vom

Tab. 13 Analyse der Oberflächenantigene mit monoklonalen Antikörpern

		OKT							LEU			B			BA-		OK		J5		
		3	4	6	8	9	10	11	9	7	M1	1	2	4	1	2	Ia1	M1	(CALLA)	U28	My7
Kontrollen –	PB (n=31)	57	39	-	23	6	9	-	-	-	-	10	-	-	-	-	16	22	-	-	-
	KM (n=9)	41	24	1	17	-	19	-	37	3	7	9	3	-	25	8	20	18	0	7	7
ST	PB (n=9)	60	33	-	21	6	15	-	-	-	-	8	-	-	-	-	15	22	-	-	-
PZ	PB (n=4)	54	38	-	17	11	12	-	-	-	-	5	-	-	-	-	15	22	-	-	-
MW	PB (n=4)	53	35	-	15	-	10	-	-	-	-	21	-	-	-	-	24	30	-	-	-
NHL	PB (n=1)	36	14	-	18	-	-	-	24	22	2	40	0	-	50	6	45	14	0	-	-
T-ALL	PB	10	6	2	92	-	-	-	92	-	-	2	-	-	2	-	4	0	-	-	-
		30	30	-	96	-	-	-	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KM	4	-	-	-	-	-	-	66	-	-	4	-	-	10	0	8	4	0	0	-
c-ALL		16	-	-	-	-	-	-	12	-	-	25	-	-	42	60	90	4	65	0	-
		68	40	0	24	-	7	-	78	-	-	-	-	-	6	26	8	14	13	-	-
		8	5	4	4	-	-	-	9	-	4	6	-	31	91	38	80	12	18	0	4
	PB	79	56	9	18	-	-	-	69	-	4	12	-	1	74	42	10	10	18	0	2
		10	-	-	-	-	-	-	12	-	0	1	-	-	90	66	81	-	40	0	-
		8	16	25	9	-	-	-	7	-	0	4	-	5	-	8	47	8	10	1	-
		40	-	7	-	-	-	-	29	-	-	36	-	11	55	17	23	25	25	28	-
	PB	59	35	0	26	-	-	-	22	-	-	3	-	-	-	2	9	5	1	-	-
	KM	9	-	-	-	-	-	-	12	-	-	13	-	-	42	26	14	8	28	0	-
T-CLL	PB	90	85	0	95	-	-	-	85	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Sézary-S.	PB	82	86	0	17	-	6	-	60	-	-	6	-	-	-	-	-	10	-	-	-
B-CLL	PB	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	-	-	80	68	80	10	-	-	-
	PB	6	4	-	2	-	-	-	1	2	4	70	50	-	85	4	85	4	0	-	0
	KM	6	2	-	3	-	-	-	5	4	3	80	55	-	86	0	90	3	0	-	0
	PB	-	-	0	-	-	-	-	36	-	-	10	-	-	40	0	40	11	0	0	0
	LK	0	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0	0	100	0	80	0	0	-	-
PZL	KM	-	-	-	-	-	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AML		15	-	-	-	-	-	-	42	-	-	6	-	-	6	-	-	10	0	-	-
		6	35	-	30	-	-	-	54	-	-	14	-	-	45	90	40	24	0	-	-
		10	-	-	-	-	-	-	90	-	-	-	-	-	6	0	45	4	0	0	-
	PB	-	-	-	-	-	-	18	19	-	-	20	-	-	14	10	-	12	8	10	-
		0	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0	-	0	0	0	0	90	0	0	-
		0	-	0	-	-	-	-	0	-	30	0	-	0	0	70	0	30	0	0	0
		3	1	0	1	-	-	-	10	-	-	4	-	0	6	17	14	12	0	0	4
		0	-	6	-	-	-	-	0	-	10	0	-	-	0	-	0	0	0	-	0
	KM	11	-	-	-	-	58	-	14	1	-	5	-	3	21	3	2	6	-	2	-
		10	-	0	-	-	-	-	10	-	26	1	-	0	4	2	0	9	0	0	10
CML	PB	9	-	-	-	-	0	-	4	0	-	3	-	-	12	0	10	2	0	1	-
CML-BK	PB	6	-	-	-	-	-	-	10	-	8	2	-	0	1	7	30	12	0	10	9
		8	-	-	-	-	-	-	30	-	-	7	-	0	11	40	26	-	0	42	6

Legende:

PB : peripheres Blut; KM : Knochenmark; LK : Lymphknoten; n = Anzahl der Personen

ST : Solide Tumoren

PZ : Plasmozytom

MW : Morbus Waldenström

NHL : Non-Hodgkin-Lymphom (B-Zell-Typ)

PZL : Plasmazell-Leukämie

CML-BK : CML in Blastenkrise

Angabe der positiven Zellen in %; bei n > 1 Angabe des Mittelwerts

Tab. 14 Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Proliferation bei gesunden Personen

			MEDIUM	PHA	CON A	PWM	MAS	OKT3	IL-2	TPA + PHA
Peripheres Blut	IFN	$\bar{X}$	7	85	53	165	30	56	19	25
		S	16	147	94	239	38	136	7	13
		n	65	61	39	62	38	38	3	3
	IL-2	$\bar{X}$	0,3	28	15	57	4	0,7	-	-
		S	1,5	42	19	66	5	1,3	-	-
		n	35	37	11	32	12	11	-	-
	Prolif.	$\bar{X}$	3.000	116.000	63.000	48.000	32.000	18.000	45.000	59.000
		S	2.000	58.000	65.000	28.000	31.000	15.000	16.000	57.000
		n	65	65	42	65	41	41	3	3
Knochenmark	IFN	$\bar{X}$	5	135	43	166	22	15	34	81
		S	7	221	33	221	22	21	36	71
		n	10	10	4	9	5	5	8	8
	IL-2	$\bar{X}$	0	14	-	31	-	-	-	-
		S	0	-	-	15	-	-	-	-
		n	2	1	-	2	-	-	-	-
	Prolif.	$\bar{X}$	9.000	152.000	51.000	52.000	22.000	20.000	93.000	63.000
		S	5.000	83.000	49.000	31.000	12.000	18.000	41.000	62.000
		n	10	10	4	9	5	5	8	8

Legende:

Kultur: IFN/Prolif. : 1×10^5 PBL bzw. KM-Zellen/well in R10F$^+$

IL-2 : 2×10^6 PBL bzw. KM-Zellen/well in R10F$^+$

Dauer : IFN/Prolif. : 4d ; IL-2: 2d

Mitogene: PHA 1 µg/ml; PWM 0,5 µg/ml; Con A 10 µg/ml; MAS 1:35; OKT3 1:350; IL-2 1:7; TPA 7 ng/ml.

Proliferation (Prolif.) in dpm, IFN in Einheiten, IL-2 in % vom Standard

$\bar{X}$ Mittelwert; S Standardabweichung; n Anzahl der untersuchten Personen (nicht aufgeführt, wenn n = 1)

Tab. 15 Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Proliferation bei unterschiedlichen Patienten

			MEDIUM	PHA	CON A	PWM	MAS	OKT3
Solide Tumoren	IFN	$\bar{X}$	3	29	28	47	7	11
		S	3	40	30	53	6	12
		n	14	14	14	14	10	14
	IL-2	$\bar{X}$	0,6	25	5	91	0	1
		S	1,1	30	6	118	0	1
		n	9	9	6	9	3	5
	Prolif.	$\bar{X}$	1.000	54.000	41.000	32.000	12.000	17.000
		S	600	58.000	64.000	39.000	8.000	32.000
		n	14	14	14	14	10	14
Maligne Paraproteinämien	IFN	$\bar{X}$	8	136	18	256	30	73
		S	15	193	21	355	55	152
		n	9	9	9	9	9	9
	IL-2	$\bar{X}$	0,2	15	n.d.	34	n.d.	n.d.
		S	0,7	24		38		
		n	8	8	0	6	0	0
	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	68.000	29.000	38.000	15.000	13.000
		S	900	44.000	30.000	22.000	15.000	11.000
		n	9	9	9	9	9	9
NHL	IFN	$\bar{X}$	2	76	10	73	2	13
		S	3	90	1	80	2	19
		n	2	2	2	2	2	2
	IL-2	$\bar{X}$	1,5	104	n.d.	147	n.d.	n.d.
		S	2,1	123		188		
		n	2	2	0	2	0	0
	Prolif.	$\bar{X}$	2.000	26.000	9.000	12.000	6.000	2.000
		S	600	31.000	8.000	11.000	4.000	900
		n	2	2	2	2	2	2

Legende:

siehe Tab. 14

Standard sehr viel, aber nicht signifikant mehr Interleukin-2 produziert als bei den Kontrollen, mit den anderen Mitogenen (außer ConA) war die IL 2-Produktion vergleichbar.Die Lymphoproliferation war in den meisten Fällen signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollen.

3.3.3. Untersuchung an Patienten mit nicht-leukämischen hämatologischen Erkrankungen

Unter diesem Oberbegriff wurden die Patienten mit malignen Paraproteinämien (M.P.) und mit einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) vom B-Zell-Typ zusammengefaßt. Bei diesen Patienten waren maligne Zellen im Knochenmark, aber noch nicht in der peripheren Blutzirkulation vorhanden. Es handelte sich um 5 Patienten mit Plasmozytom, 4 Patienten mit Morbus Waldenström und um 2 Patienten mit NHL.

Bei den Patienten mit malignen Paraproteinämien liegt ein weitgehend normales peripheres Differentialblutbild bei stark erhöhtem Serumeiweiß vor. Diese Patienten zeigten im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv nicht signifikant erhöhte Interferontiter nach Induktion mit PWM, PHA und OKT3 und ähnliche oder verringerte Titer mit den übrigen Mitogenen (siehe Tab. 15). Sowohl die IL 2-Produktion als auch die Lymphoproliferation waren erniedrigt, letztere nach PHA-, ConA- und MAS-Induktion mit Irrtumswahrscheinlichkeiten α zwischen 0,005 und 0,05 (siehe Tab. 18).
Eine untersuchte Patientin mit einer benignen Paraproteinämie, d.h. mit einem Plasmozytom-freien Beckenkamm, zeigte dagegen Interferon-Titer wie die gesunden Kontrollen, also niedrigere Titer als die oben genannten Patienten mit malignen Paraproteinämien. Auch die IL 2-Produktion und Lymphoproliferation entsprachen denen der Kontrollen, lagen also über den bei den Patienten mit M.P. gemessenen Werten.

Die Patienten mit NHL zeigten mit den gesunden Blutspendern vergleichbare (PHA) oder erniedrigte Interferontiter bei verringerter Proliferation und stark gesteigerter Interleukinaktivität. Obgleich es sich hier nur um 2 Patienten handelte, wurde auch hier die fehlende Korrelation zwischen den Interferon- und Interleukin 2-Titern deutlich. - Wegen der geringen Anzahl an untersuchten Patienten wurden die Unterschiede nicht statistisch untersucht.

Ein direkter Vergleich zwischen bei Patienten mit malignen Paraproteinämien vorliegendem „gesunden" peripheren Blut und „entartetem" Knochenmark war in 2 Fällen möglich: ein Plasmozytompatient zeigte im KM im Vergleich zum PB eine verringerte (PHA, PWM) bis gleiche IFN-Produktion, eine verringerte (PHA) bis gleiche Proliferation und eine ähnliche IL 2-Produktion (nur mit PHA getestet). Ein Patient mit Morbus Waldenström zeigte im KM und PB vergleichbare Interferontiter und Wachstumsraten (die Interleukin 2-Produktion im KM konnte nicht bestimmt werden).

3.3.4. Untersuchung an Patienten mit lymphatischen Leukämien

Diese sehr heterogene Gruppe wurde nach dem Differenzierungsgrad der entarteten Zellen eingeteilt in:
- unreife T-Zellen (T-ALL)
- unreife B-Zellen (c-ALL)
- reife T-Zellen (T-CLL, Sézary-Syndrom)
- reife B-Zellen (B-CLL, Plasmazell-Leukämie)

(siehe auch Abb. 2 auf Seite 19)

Wenn nicht anders vermerkt, wurden periphere Blutlymphozyten untersucht. Die Phänotypen der mononukleären Zellen, bestimmt mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, zeigt Tabelle 13.
Die Versuchsergebnisse sind Tabelle 16 zu entnehmen: In der Gruppe der Patienten mit T-ALL wurden 3 Personen untersucht: alle gemessenen Parameter waren sehr stark erniedrigt oder gleich Null: IFN wurde außer nach Stimulation mit Interleukin-2 überhaupt nicht gebildet, die IL 2-Produktion war negativ, auch Lymphoproliferation war kaum vorhanden. Das Knochenmark eines Patienten mit T-ALL (nicht aufgeführt in der Tabelle) zeigte sich mit 3000 dpm und 0 Einheiten IFN nach PHA-Stimulation genausowenig reaktiv wie die peripheren Blutzellen der beiden anderen Patienten mit T-ALL.

In der Gruppe der Patienten mit unreifen, entarteten B-Zellen wurden 8 Patienten mit c-ALL untersucht, die Reaktionen waren im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant erniedrigt, jedoch stärker als bei den

Patienten mit T-ALL. Die IFN-Produktion und Proliferation waren am stärksten nach PHA-Stimulation, die IL 2-Titer höher nach PWM-Zugabe. Die spontanen IFN-Titer waren gering und entsprachen denen der Kontrollpersonen.

Die Patienten mit entarteten, reifen T-Zellen (je 1 Person mit T-CLL und mit Sézary-Syndrom) lagen in ihrer Reaktion zwischen den T-ALL und den c-ALL Patienten, d.h. IFN und IL-2 wurden mit maximal 14 Einheiten bzw. 5 % vom Standard mäßig gebildet.
Die Wachstumsrate war nach Stimulation mit PHA, IL-2 oder TPA plus PHA annähernd (PHA) bzw. genauso hoch wie bei den gesunden Personen, die übrigen Mitogene bewirkten keine Proliferation. Spontan zeigten diese Patienten geringe IFN-Titer.
In der Gruppe der Patienten mit entarteten reifen B-Zellen wurden 4 Personen untersucht, darunter von je einem Patienten peripheres Blut und Lymphknoten, von 2 Patienten sowohl peripheres Blut als auch Knochenmark. Die B-Zellen aus dem Lymphknoten (100 % BA-1-positiv und 80 % Ia-positiv) konnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen weder Interferon produzieren noch wachsen,dagegen waren minimale Interleukin 2-Titer meßbar. In ähnlicher Weise waren die Zellen aus dem Knochenmark kaum in der Lage, auf die Mitogenstimulation zu reagieren. Die Zellen aus der Peripherie zeigten mit 19 und 8 Einheiten IFN und 10 % und 9 % vom IL 2-Standard nur nach PHA- bzw. PWM-Stimulation eine sehr geringe Aktivität, allein PHA induzierte hier mit 11.000 dpm ein geringes Wachstum. Der Vergleich von PB und KM derselben 2 Patienten erbrachte sehr ähnliche Lymphokinproduktion und Wachstumsraten.

3.3.5. Untersuchung an Patienten mit myeloischen Leukämien

Die Einteilung der myeloischen Leukämien erfolgte in:
- unreife granulozytäre und monozytäre Zellen (AML FAB 1-5)
- reife Granulozyten und deren Vorstufen (CML, CML in Blastenkrise)

Es wurde das periphere Blut von 8 Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt:
Auffällig war eine mit im Mittel 20 Einheiten hohe spontane Interferonproduktion. Auch die mitogeninduzierten IFN-Titer waren relativ hoch und in Antwort auf OKT3 sogar vergleichbar mit den Titern der Kontrollpersonen. Interleukin-2 wurde mit 30 % vom Standard in ähnlicher Höhe gebildet wie bei den gesunden Testpersonen, die Thymidin-Einbaurate war dagegen signifikant reduziert und nur in Antwort auf OKT3 vergleichbar mit den Kontrollen. - Die Knochenmark-Zellen von weiteren 4 untersuchten Patienten mit AML zeigten spontan keine Interferontiter, nach Mitogeninduktion aber ähnliche Werte wie die peripheren Blutzellen der AML-Patienten. Nach Stimulation mit OKT3 waren die IFN-Titer im KM sogar doppelt so hoch wie im PB. Die Interleukin 2-Produktion konnte nur an den KM-Zellen von einem Patienten untersucht werden und entsprach der im PB. Die spontane, MAS-und OKT3-induzierte Proliferation war im KM mit 19.000 bzw. 40.000 dpm erhöht im Vergleich zum PB der AML-Patienten und zum Kontrollkollektiv; nach Stimulation mit PHA, ConA und PWM entsprach sie dem PB der AML-Patienten. Auffällig bei dieser Patientengruppe war eine negative Korrelation zwischen Interferon-Titern und Proliferationswerten: im peripheren Blut fielen v.a. spontan hohe IFN-Produktion und geringe Thymidineinbauraten zusammen, im Knochenmark war es umgekehrt.

Die 2 untersuchten Patienten mit CML, also mit entarteten reifen Granulozyten, zeigten im PB spontan geringe, aber nach Stimulation mit PHA, PWM und OKT3 ausgesprochen hohe IFN-Werte. Die IL 2-Produktion war mäßig, die Proliferation war mit 30.000 dpm spontan stark erhöht, nach Mitogeninduktion entsprach sie den Werten aus dem KM von AML-Patienten. Das Knochenmark von einem Patienten mit CML zeigte sich im Vergleich mit den autologen Zellen der Peripherie in der Interferonproduktion ähnlich aktiv, in der Proliferation stark erniedrigt.

Es wurden auch 2 Patienten mit CML in Blastenkrise, d.h. in einer akuten Phase, die durch eine abnehmende Zellreife charakterisiert ist, untersucht: die IFN-Titer waren gering, die IL 2-Produktion mäßig und die Proliferationswerte sehr gut: spontan und nach ConA, PWM und OKT3-Sti-

mulation waren sie von allen untersuchten Personengruppen hier am höchsten. Auch bei dieser Patientengruppe war eine Diskordanz zwischen Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Proliferation zu beobachten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an peripherem Blut und Knochenmark der Leukämiepatienten sind in Abb. 8 noch einmal graphisch dargestellt. Aufgetragen sind spontane und mitogeninduzierte Aktivitäten; die Interferon- und Interleukin 2-Produktion wurde in Antwort auf PWM, die Proliferation in Antwort auf PHA gezeigt, da diese Mitogene im Mittel die beste Stimulationskapazität hatten.

Eine (positive oder negative) Korrelation zwischen IFN- und IL 2-Titern und einem von beiden und der Proliferation, darstellbar mit einer Regressionsgraden, wurde bei keinem der untersuchten Personenkollektive festgestellt. In der Gruppe der Kontrollspender lediglich fielen nach PWM-Stimulation häufig in eine Richtung gehende IL 2-Titer und ^{3}H-Thymidineinbauraten auf. Sonstige Tendenzen der Abhängigkeit sind bereits bei den jeweiligen Patientengruppen behandelt worden.

Aus den bisher erhaltenen Daten von Leukämiepatienten sah es so aus, als ob vor allem reife T-Zellen und myeloische Zellen Interferon produzieren können. Auffällig waren auch die Interferontiter in den Zellkulturüberständen von Patienten mit c-ALL.

Da bei allen Leukämiepatienten immer nur ein Teil der im Testansatz vorhandenen Zellen maligne entartet, wie z.B. c-ALLA-positiv, waren, ließ sich die Menge und die Subklasse des gebildeten Interferons nicht diesen Zelltypen zuschreiben: das Interferon konnte genausogut von den in geringen Prozentsätzen vorhandenen reifen T-Zellen stammen. Können nur reife T-Zellen Interferon bilden? Wie ist der Einfluß von myeloischen Zellen zu bewerten? Im Folgenden wurde versucht, der Antwort auf diese Fragen durch Untersuchungen an isolierten Zell-Subpopulationen etwas näherzukommen.

Tab. 16 Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Proliferation bei Patienten mit lymphatischen Leukämien

				MEDIUM	PHA	CON A	PWM	MAS	OKT3	IL-2	PHA+TPA
unreife T-Zellen T-ALL	IFN		$\bar{x}$	0	0	0	0	0	0	5	0
			S	0	0	0	0	0	-	0	0
			n	2	2	2	2	2	1	2	2
	IL-2	PB	$\bar{x}$	0	0	-	0	-	-	-	-
			S	0	0	-	0	-	-	-	-
			n	2	2	-	2	-	-	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	300	6.000	3.000	3.000	1.000	1.000	3.000	8.000
			S	100	0	1.000	2.000	1.000	-	1.000	9.000
			n	2	2	2	2	2	1	2	2
unreife B-Zellen C-ALL	IFN		$\bar{x}$	6	28	14	17	17	2	-	-
			S	16	26	30	17	36	3	-	-
			n	8	8	7	8	5	8	-	-
	IL-2	PB	$\bar{x}$	0,7	4	-	10	-	-	-	-
			S	0,6	3	-	5	-	-	-	-
			n	3	5	-	4	-	-	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	3.000	86.000	41.000	15.000	7.000	6.000	-	-
			S	3.000	77.000	83.000	14.000	5.000	9.000	-	-
			n	8	8	8	8	6	8	-	-
reife T-Zellen T-CLL, Sézary-S.	IFN		$\bar{x}$	4	12	9	5	14	3	5	5
			S	1	3	12	6	19	4	-	-
			n	2	2	2	2	2	2	1	1
	IL-2	PB	$\bar{x}$	1	2	-	5	-	-	-	-
			S	-	3	-	-	-	-	-	-
			n	1	2	-	1	-	-	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	2.000	51.000	4.000	4.000	2.000	3.000	66.000	55.000
			S	1.500	68.000	1.500	2.000	0	3.000	-	-
			n	2	2	2	2	2	2	1	1
reife B-Zellen B-CLL, Plasmazell-Leukämie	IFN		$\bar{x}$	0	19	1	8	0	0	-	-
			S	-	9	1	7	0	0	-	-
			n	3	3	3	3	3	3	-	-
	IL-2	PB	$\bar{x}$	0	10	-	9	-	-	-	-
			S	-	7	-	6	-	-	-	-
			n	1	2	-	2	-	-	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	1.000	11.000	1.000	4.000	1.000	2.000	-	-
			S	800	6.000	600	1.000	0	300	-	-
			n	3	3	3	3	2	3	-	-
	IFN		$\bar{x}$	2	0	0	6	0	0	-	-
			S	2	-	0	1	0	0	-	-
			n	2	1	2	2	2	2	-	-
	IL-2	KM	$\bar{x}$	0	4	-	5	-	-	-	-
			S	0	1	-	2	-	-	-	-
			n	2	2	-	2	-	-	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	1.000	9.000	2.000	3.000	2.000	3.000	-	-
			S	1.000	3.000	1.500	3.000	1.500	2.000	-	-
			n	2	2	2	2	2	2		
	IFN			0	0	0	0	0	0	-	-
	IL-2	LK		0	2	-	5	-	-	-	-
	Prolif.			1.000	3.000	2.000	2.000	1.000	2.000	-	-

Legende:

siehe Tab. 14

PB : peripheres Blut; KM : Knochenmark; LK : Lymphknoten

Tab. 17 Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Proliferation bei Patienten mit myeloischen Leukämien

				MEDIUM	PHA	CON A	PWM	MAS	OKT3
unreife myeloische Zellen AML (FAB M1-M5)	IFN		$\bar{x}$	20	51	46	20	3	50
			s	44	60	60	18	5	87
			n	7	7	7	7	7	7
	IL-2	PB	$\bar{x}$	2	30	-	25	-	-
			s	4	45	-	32	-	-
			n	4	6	-	4	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	4.000	17.000	16.000	11.000	15.000	24.000
			s	4.000	18.000	33.000	10.000	22.000	35.000
			n	7	8	7	7	7	7
	IFN		$\bar{x}$	1	50	10	33	5	108
			s	2	70	14	42	4	117
			n	3	3	3	3	3	3
	IL-2	KM	$\bar{x}$	-	24	-	-	-	-
			s	-	-	-	-	-	-
			n	-	1	-	-	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	19.000	34.000	32.000	20.000	39.000	43.000
			s	24.000	30.000	25.000	22.000	49.000	35.000
			n	4	4	3	4	3	3
reife Granulozyten CML	IFN		$\bar{x}$	5	70	3	212	9	123
			s	6	99	4	293	13	169
			n	2	2	2	2	2	2
	IL-2	PB	$\bar{x}$	1	1	-	12	-	-
			s	-	0	-	5	-	-
			n	1	2	-	2	-	-
	Proljf.		$\bar{x}$	30.000	46.000	31.000	25.000	22.000	50.000
			s	15.000	18.000	3.000	13.000	18.000	7.000
			n	2	2	2	2	2	2
	IFN			0	13	0	6	0	0
	IL-2	KM		-	-	-	-	-	-
	Prolif.			3.000	7.000	3.000	5.000	3.000	3.000
CML-Blastenkrise	IFN		$\bar{x}$	0	10	14	13	0	0
			s	0	9	0	6	0	0
			n	2	2	2	2	2	2
	IL-2	PB	$\bar{x}$	0	16	-	24	-	-
			s	-	-	-	-	-	-
			n	1	1	-	1	-	-
	Prolif.		$\bar{x}$	72.000	96.000	98.000	113.000	22.000	108.000
			s	76.000	66.000	73.000	64.000	24.000	68.000
			n	2	2	2	2	2	2

Legende:

siehe Abb. 14

Tab. 18 Signifikanzen α nach dem U-Test (Mann & Whitney)

	IFN-Prod.	IL 2-Prod.	Proliferation
Vergleich der Kontrollen mit Pa mit S.T.			
PHA	n.s.	n.s.	0.001
CONA	n.s.	n.s.	0,05
PWM	n.s.	n.s.	0,02
MAS	n.s.	n.d.	n.s.
OKT3	0,05	n.d.	0,01
Vergleich der Kontrollen mit Pa mit M.P.			
PHA	n.s.	n.s.	0,005
CONA	n.s.	n.d.	0,05
PWM	n.s.	n.s.	n.s.
MAS	n.s.	n.d.	0,05
OKT3	n.s.	n.d.	n.s.
Vergleich der Kontrollen mit Pa mit c-ALL			
PHA	n.s.	n.s.	0,05
CONA	0,008	n.d.	0,03
PWM	0,03	0,008	0,00005
MAS	0,05	n.d.	0,004
OKT3	0,007	n.d.	0,001
Vergleich der Kontrollen mit Pa mit AML			
PHA	n.s.	n.s.	0,00005
CONA	n.s.	n.d.	0,006
PWM	n.s.	n.s.	0,00005
MAS	0,003	n.d.	0,005
OKT3	n.s.	n.d.	n.s.

Legende:

S.T. = Solide Tumoren

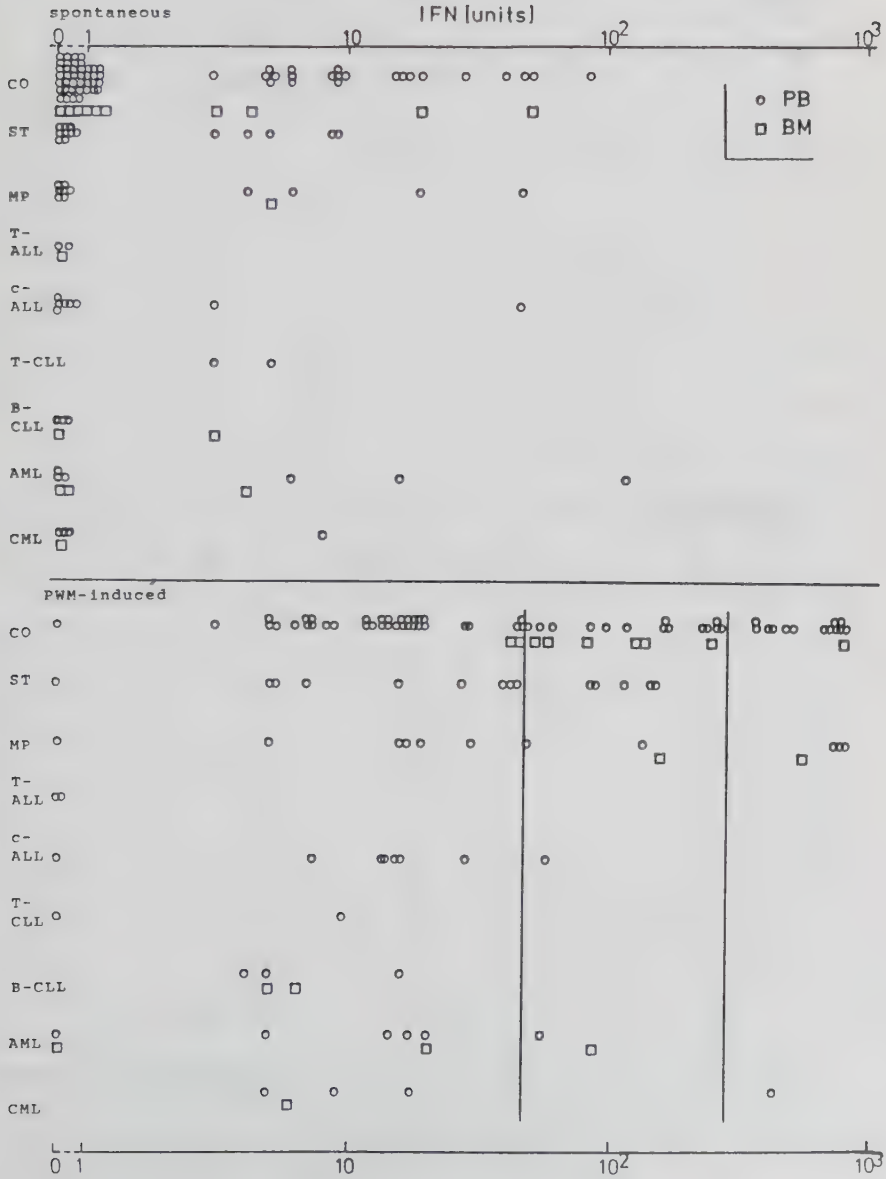
M.P. = Maligne Paraproteinämien

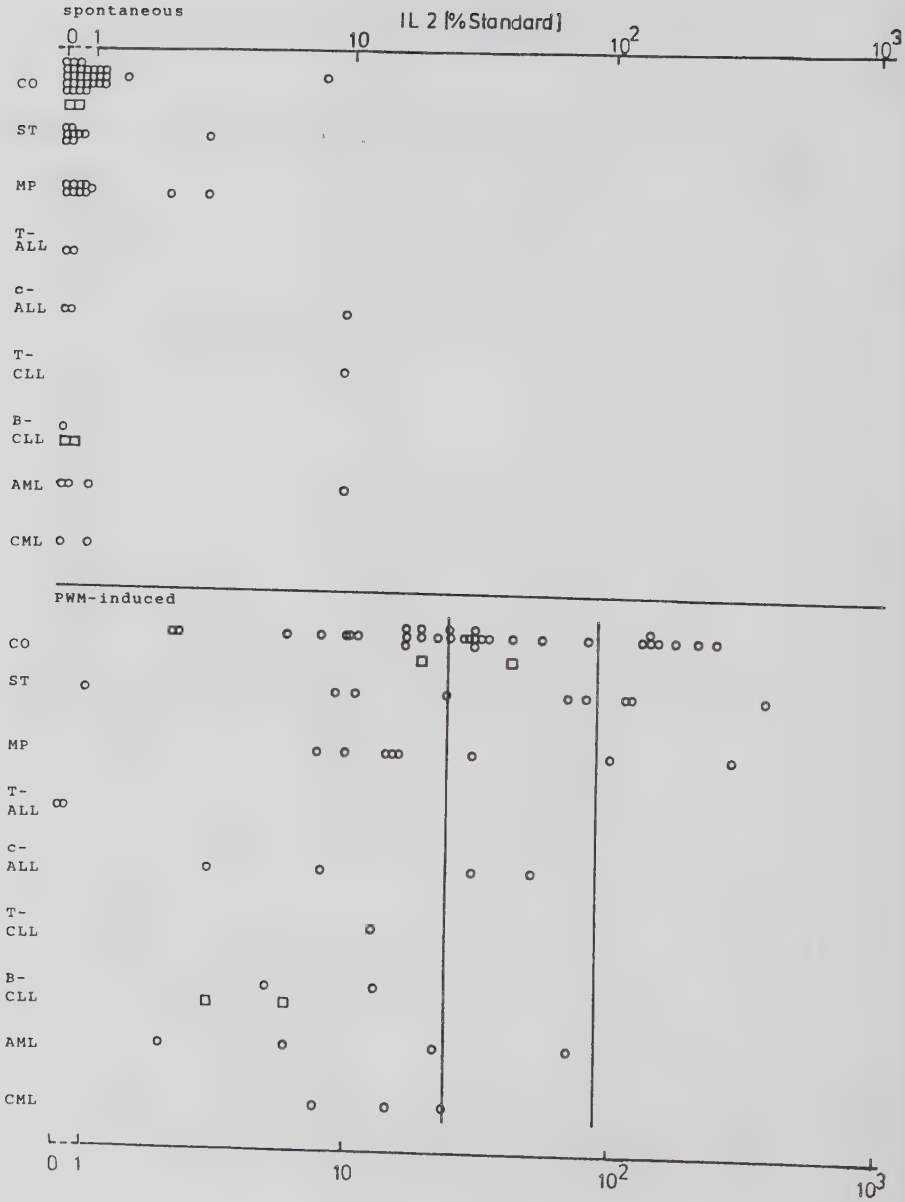
n.s. = nicht signifikant, d.h. $\alpha > 0,05$

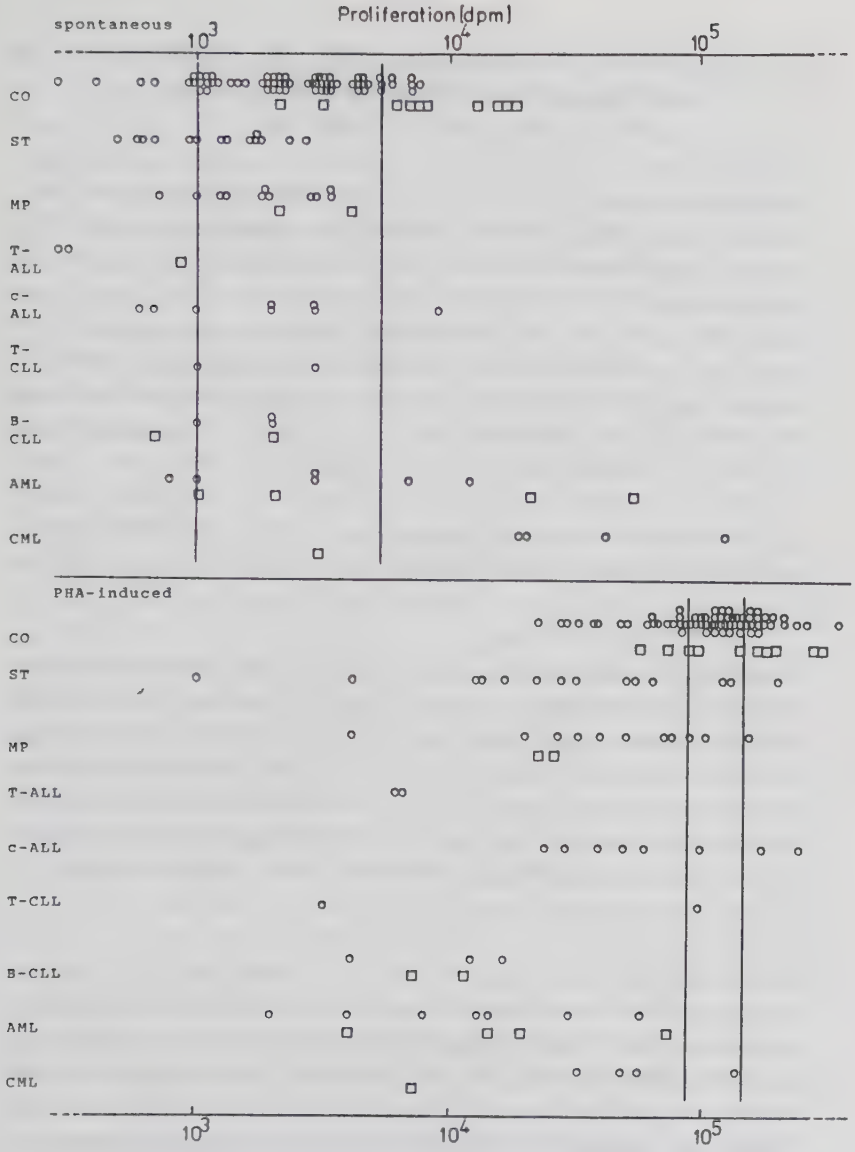
n.d. = nicht bestimmt

Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen an peripherem Blut; die Resultate der Versuche mit anderen Patientengruppen wurden wegen der geringen Anzahl an Personen nicht statistisch ausgewertet.

Abb.8 Spontane und Mitogen-induzierte Lymphokin-produktion und Proliferation




spontaneous
IL 2 [% Standard]
0 1
10
10^2
10^3
CO
ST
MP
T-ALL
c-ALL
T-CLL
B-CLL
AML
CML
PWM-induced
CO
ST
MP
T-ALL
c-ALL
T-CLL
B-CLL
AML
CML
0 1
10
10^2
10^3



Legende zu Abb.8

CO : Kontrollpersonen
ST : Pat. mit soliden Tumoren
MP : Pat. mit malignen Paraproteinämien und NHL vom B-Zelltyp
T-CLL: Pat. mit T-CLL und Sézary-Syndrom
B-CLL: Pat. mit B-CLL und Plasmazell-Leukämie

die Balken kennzeichnen $\bar{x} \pm s$ des Kontrollkollektivs

3.4. Fähigkeit von Zellsubpopulationen aus peripherem Blut und Knochenmark zur Interferonproduktion; Vergleich mit der Interleukin 2-Produktion und Proliferation

Die Zell-Subpopulationen wurden folgendermaßen isoliert: Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark wurden zuerst mittels Nylonwolle oder Schafserythrozyten in T- und B-Zellen (sieh 2.3.3.) und anschließend mittels Protein A-beschichteter Rindererythrozyten und monoklonaler Antikörper in T- und B-Zell-Subpopulationen (siehe 2.3.4.) aufgetrennt. Zu Anfang(bei den Patienten mit soliden Tumoren) wurde Nylonwolle zur Trennung von adhärenten B-Zellen und Monozyten und nichtadhärenten T-Zellen verwendet, um eine in der Literatur beschriebene Fremdaktivierung der Zellen durch die Schafserythroyzten (74) zu umgehen. In den weiteren Versuchen wurde größerer Wert auf den Erhalt der als "SRBC-Rezeptor-positiv" definierten T-Zell-Subpopulation gelegt, und die mononukleären Zellen wurden deshalb mit Schafserythrozyten rosettiert.

Die Ergebnisse der mit getrennten Zellpopulationen durchgeführten Versuche sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Phänotypen der getrennten Zellen und damit die Güte der Zelltrennungen sind aus Tabelle 20 zu entnehmen: die positiv getrennte Population wurde maximal zu 90 % angereichert, dabei verblieben 1-5 % der unerwünschten Population. Mehrfache Rosettierungen und damit größere Reinheitsgrade konnten wegen der beschränkten Ausgangsmenge an Zellmaterial nicht ausgeführt werden.

3.4.1. B-Zellen

Die peripheren B-Zellen gesunder Spender (siehe die Non-T OKM-negative Fraktion in Tab. 19) zeigten spontan und nach Stimulation mit PHA keine Interferonproduktion und kaum Proliferation. Im Knochenmark gesunder Menschen konnte die Non-T OKM-negative Zellpopulation nicht getestet werden, die geringe IFN-Produktion durch die Non-T-Zellen wird jedoch auf die noch verbliebenen 3 % an reifen, OKT3-positiven Zellen (siehe Tab. 20) zurückgeführt. Die Non-T-Zellen aus dem KM bildeten kein Interleukin-2 und zeigten mäßiges Wachstum.

Gesunde periphere B-Zellen von Patienten mit maligner Erkrankung (siehe die Non-T-Fraktion bei Patienten mit soliden Tumoren in Tab. 19) produzierten weder Interferon noch Interleukin-2, noch proliferierten sie. Auch maligne, reife B-Zellen aus dem peripheren Blut zeigten weder Lymphokinproduktion noch Wachstum,was sich bei der Untersuchung der Non-T-Fraktion eines Patienten mit B-CLL nach Entfernung der adhärenten Zellen herausstellte. Ebensowenig waren reife, maligne B-Zellen (100 % BA-1-positiv; 80 % OK Ia-positiv, alle T-Zell-Marker negativ) aus dem Lymphknoten eines anderen Patienten mit B-CLL in der Lage, IFN zu bilden, wie aus Tabelle 16 hervorgeht. Zu beobachten war hier mit 2 % und 5 % vom Standard nach PHA- bzw. PWM-Stimulation eine geringe Interleukin 2-Produktion.

3.4.2. T-Zellen

Die peripheren und aus dem KM stammenden T-Zellen gesunder Blutspender produzierten außer nach Stimulation mit IL-2 und TPA plus PHA weniger Interferon als die gesamte Fraktion der mononukleären Zellen, die IL 2-Titer und die Wachstumsraten waren in beiden Fraktionen vergleichbar.
Periphere T-Zellen (PBT) von Patienten mit soliden Tumoren zeigten eingeschränkte Lymphokinbildung und Wachstumsraten im Vergleich zur Gesamtfraktion. Anders verhielt es sich bei den T-Zellen aus einem Thymom, einer malignen Geschwulst, bei der reife T-Zellen den Thymus infiltrieren: die Zellen mit dem Phänotyp OKT 3, 4, 6, 8, 10 und Leu 9 (siehe Abb. 9) waren nicht in der Lage, nach Mitogenstimulation Interferon zu bilden oder zu proliferieren, dagegen waren geringe Interleukin 2-Titer nach PWM-Stimulation meßbar (Daten nicht abgebildet). Die fehlende Interferonproduktion durch diese Mischung an reifen und unreifen T-Zellen konnte im Charakter der malignen Zellen oder aber eventuell an einer zu geringen Zahl an vorhandenen Monozyten/Makrophagen liegen. Letzteres ist wohl auszuschließen, wie die Fluoreszenzanalyse mit dem monoklonalen Antikörper OKM1 zeigt (siehe Abb. 9).
Aus Tabelle 16 war schon zu entnehmen, daß die malignen, (unreifen) T-Zellen der Patienten mit T-ALL unter den gegebenen Bedingungen kein Interferon bildeten. Liegt der Grund dafür im Fehlen von hilfeleistenden monozytären Zellen oder im frühen Differenzierungsgrad, also in der Unreife der T-Zellen?

Die Resultate der T-Zell-Trennungen mit dem Antikörper Leu 9 in frühe und reife (Leu 9-positive Fraktion) und nur reife (Leu 9-negative Fraktion) T-Zellen zeigt Tabelle 19: beide Fraktionen aus dem PB und aus dem KM produzierten Interferon in ähnlicher Menge, die T-Leu 9-positive Population (zu 80 % Leu 9-positiv) proliferierte jedoch besser als die T-Leu 9-negative Population. Im KM konnte bei der T-Leu 9-positiven Fraktion mit 5 - 11 % vom Standard auch mitogeninduzierte IL 2-Produktion gemessen werden.

Bei der gleichzeitigen Trennung mit den monoklonalen Antikörpern OKT4 und OKT8 (siehe Tab. 19) zeigte die OKT4,8-negative Fraktion aus dem peripheren Blut gesunder Spender höhere Interferontiter, aber ein geringeres Wachstum als die OKT4,8-positive Fraktion. Die aus dem KM stammende OKT4,8-negative Fraktion produzierte mehr IFN und proliferierte auch besser als die OKT4,8-positive Fraktion. Auch war bei den negativ-getrennten Populationen eine spontane Proliferation zu beobachten, was auf eine Zellaktivierung durch die Trennungs-Prozeduren hinweist.
Auch wenn die Zelltrennungen nur mit maximaler Reinheit von 85 % bei der positiv-selektionierten Population ausgeführt werden konnten, weisen sie doch deutlich auf die Fähigkeit reifer und auch unreifer gesunder T-Zellen hin, Interferon zu bilden.

3.4.3. OKM-positive Zellen

Die aus dem Knochenmark gesunder Personen isolierten Monozyten (Non-T-OKM-positive Fraktion, zu 90 % angereichert, siehe Tabelle 19) bildeten kein Interferon und proliferierten nicht. Die gleiche Fraktion aus dem PB gesunder Personen produzierte in einem Fall bis auf 6 Einheiten nach IL 2-Stimulation gar kein IFN, im anderen Fall beträchtliche Mengen, sodaß im Mittel die in Tab. 19 dargestellten Titer resultierten. Die Fraktionen waren nur zu 80 % OKM-positiv, kontaminierende T-Zellen wurden in der Ausgangsfraktion der Trennung (Non-T-Fraktion) jedoch nur zu 2 % gezählt, sodaß der Ursprung der gemessenen IFN-Titer offenbleiben muß. Auch die Monozyten aus dem PB proliferierten kaum.

Isolierte OKM-positive T-Zellen aus dem peripheren Blut, deren Anreicherung nur zu 50 % gelang, bildeten nach Stimulation mit IL-2 und TPA plus PHA mehr, sonst gleichviel oder weniger IFN als die T-Fraktion. Die Proliferation war auf IL-2 und TPA plus PHA hin geringer, sonst gleich der T-Fraktion.

Der Einfluß von monozytären Zellen auf die Interferonproduktion wurde auch durch Zusätze dieser Zellen zu unterschiedlichen Zellpopulationen untersucht:

Der Zusatz von 10 - 20 % Plastik-adhärenter Zellen, also v.a. Monozyten, zu der Non-T- und T-Fraktion aus dem peripheren Blut eines Patienten mit B-CLL hatte weder auf die IFN-Produktion noch auf die Proliferation eine Auswirkung (s. Tab. 19).

Bei gesunden peripheren T-Zellen und T OKM^+-Zellen jedoch wurde durch den 10 % Zusatz von Non-T-OKM^+-Zellen, also Monozyten von einem Kontrollspender, die Interferonproduktion 1,3- bis 4-fach und die Proliferation maximal 2-fach verstärkt (Daten nicht abgebildet).

Da die Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie im Zellkulturüberstand hohe Interferontiter aufwiesen (siehe Tab. 17), wurde die Wirkung dieser malignen Zellen auf gesunde PBL und PBT untersucht: jeweils $3{,}3x10^5$ Zellen aus der Peripherie oder dem Knochenmark zweier Patienten mit AML wurden zu den $1x10^5$ PBL oder PBT zugesetzt, und die Interferonproduktion und ^{3}H-TdR-Einbaurate wurde nach 4 Tagen bestimmt. Die Phänotypen der AML-Zellen und die Resultate der Versuche sind Tabelle 21 zu entnehmen. Die Ergebnisse stellen die Daten eines einzelnen Versuchs dar und sind durch Wiederholung an einer anderen Kontrollperson bestätigt worden. Die Interferonproduktion wurde spontan und nach Mitogenstimulation v.a. durch die zugesetzten AML-Zellen aus der Peripherie verstärkt, was auf den höheren Anteil OKM-positiver Zellen, aber auch OKT3-positiver Zellen, im Vergleich zu den AML-KM-Zellen zurückzuführen ist. Auch im Kontrollansatz mit $1x10^5$ Zellen/well nur der AML-Patienten zeigten die PBL höhere Interferontiter, dagegen geringere Wachstumsraten als die KM-Zellen. Die spontane und Mitogen-induzierte Proliferation wurde dementsprechend durch die KM-Zellen des Patienten häufig in größerem Maße verstärkt als durch die Zellen aus der Peripherie.

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen schließen, daß Monozyten allein unter den verwendeten Testbedingungen nicht in der Lage sind, Interferon zu bilden, daß sie aber,zugesetzt zu reifen oder unreifen T-Zellen, zu einer Verstärkung der Interferonproduktion führen.

Bei der Stimulation der unterschiedlichen Zellfraktionen mit TPA plus PHA war eine Steigerung in der Interferonproduktion zu beobachten bei folgenden Fraktionen aus dem peripheren Blut: in der Gesamtfraktion der PBL, in der T-, T OKM^--, T Leu $9^{+/-}$-, T $T4,8^+$-Fraktion,nicht aber in der Non-T- und Non-T OKM^+-Fraktion, und auch nicht in den aus dem Knochenmark stammenden Zellpopulationen (s. Tab. 19).

Tab. 19 Interferonproduktion durch Zell-Subpopulationen aus Peripherem Blut und Knochenmark; Vergleich mit der IL 2-Produktion und der Proliferation

		n		MEDIUM	PHA	PWM	IL-2	TPA + PHA
Kontrollen, PB	PBL	3	IFN	0	125	94	91	131
			IL-2	-	22	15	-	-
			Prolif.	7.000	106.000	38.000	93.000	37.000
	T	3	IFN	0	106	47	64	477
			IL-2	-	36	15	-	-
			Prolif.	19.000	94.000	38.000	84.000	57.000
	Non-T	3	IFN	0	20	12	25	6
			Prolif.	4.000	5.000	3.000	6.000	3.000
	Non-T OKM^+	2	IFN	0	0	75	328	325
			Prolif.	2.000	4.000	3.000	5.000	7.000
	Non-T OKM^-	2	IFN	0	0	-	-	-
			Prolif.	2.000	6.000	-	-	-
	T OKM^+	1	IFN	4	72	72	720	> 729
			Prolif.	3.000	87.000	23.000	31.000	35.000
	T OKM^-	1	IFN	0	720	230	230	> 729
			Prolif.	3.000	92.000	40.000	47.000	60.000
	T $Leu9^+$	1	IFN	0	0	3	9	20
			Prolif.	12.000	40.000	31.000	46.000	48.000
	T $Leu9^-$	1	IFN	0	0	3	7	17
			Prolif.	2.000	21.000	8.000	22.000	10.000
	T $T4,8^+$	1	IFN	0	16	81	16	420
			Prolif.	10.000	131.000	68.000	85.000	39.000
	T $T4,8^-$	1	IFN	0	138	138	-	-
			Prolif.	21.000	56.000	14.000	-	-
Kontrollen, KM	KM	4	IFN	5	263	225	30	67
			IL-2	0	14	31	-	-
			Prolif.	10.000	143.000	35.000	112.000	35.000
	T	4	IFN	3	93	65	75	77
			IL-2	0	-	30	-	-
			Prolif.	10.000	154.000	42.000	138.000	32.000
	Non-T	4	IFN	1	3	4	8	4
			IL-2	0	0	0	-	-
			Prolif.	9.000	22.000	17.000	29.000	7.000

Tab. 19 Fortsetzung

		n		MEDIUM	PHA	PWM	IL-2	TPA + PHA
Kontrollen, KM	Non-T OKM$^+$	1	IFN	0	0	0	-	-
			Prolif.	500	500	500	-	-
	T Leu9$^+$	3	IFN	3	119	73	36	88
			IL-2	3	5	11	-	-
			Prolif.	13.000	102.000	29.000	76.000	31.000
	T Leu9$^-$	2	IFN	0	84	-	120	46
			Prolif.	9.000	43.000	-	56.000	6.000
	T T4,8$^+$	1	IFN	6	55	81	17	55
			Prolif.	3.000	115.000	61.000	113.000	63.000
	T T4,8$^-$	1	IFN	9	81	140	27	120
			Prolif.	39.000	215.000	55.000	119.000	18.000
ST	PBL	4	IFN	2	70	89		
			IL-2	-	29	52		
			Prolif.	2.000	109.000	95.000		
	T	4	IFN	1	28	18		
			IL-2	-	19	16		
			Prolif.	1.000	83.000	37.000		
	Non-T	1	IFN	0	0	0		
			IL-2	-	0	-		
			Prolif.	500	2.000	1.000		
B-CLL	PBL	1	IFN	0	14	4		
			IL-2	0	10	5		
			Prolif.	2.000	4.000	3.000		
	T	1	IFN	0	55	0		
			IL-2	0	0	0		
			Prolif.	2.000	4.000	2.000		
	Non-T	1	IFN	0	6	0		
			IL-2	0	1	2		
			Prolif.	2.000	3.000	3.000		
	Non-T Ad.Z.$^-$	1	IFN	0	1	0		
			IL-2	0	0	0		
			Prolif.	800	2.000	2.000		
	Non-T +Ad.Z.10%	1	IFN	0	5	0		
			IL-2	0	0	1		
			Prolif.	1.000	2.000	1.000		
	Non-T +Ad.Z.20%	1	IFN	0	3	0		
			IL-2	0	1	1		
			Prolif.	400	2.000	1.000		

Tab. 19 Fortsetzung

		n	MEDIUM	PHA	PWM	IL-2	TPA + PHA
B-CLL	T +Ad.Z.10%	1	IFN	0	0	0	
			IL-2	0	0	1	
			Prolif.	1.000	2.000	2.000	
	T +Ad.Z.20%	1	IFN	-	0	-	
			IL-2	-	1	-	
			Prolif.	-	1.000	-	

Legende:

ST : Solide Tumoren

Ad.Z. : Adhärente Zellen

n : Anzahl der Personen

Zellkultur : IFN/Prolif. : $1x10^5$ Zellen/well in $RlOF^+$, 4d

IL-2 : $2x10^6$ Zellen/well in $RlOF^+$, 2d

Mitogene : PHA 1 µg/ml; PWM 0,5 µg/ml; IL-2 Verd. 1:7; TPA 7 ng/ml

IFN in Einheiten, IL-2 in % vom Standard, Prolif.in dpm

Zelltrennungen : B/T-Trennung: mit SRBC oder Nylonwolle (bei Patienten mit ST)

übrige Trennungen: mit Protein A-beschichteten BRBC

Tab. 20 Phänotypen der fraktionierten Zellpopulationen

		n	T3	T4	T8	OK T4+T8	Ial	Leu M1	M1	9	B1	BA-1
Kontrollen, PB	PBL	3	63	46	28	-	8	18	-	68	13	-
	T	3	80	52	27	-	2	9	-	75	2	-
	Non-T	3	2	1	1	-	48	41	-	35	45	-
	Non-T OKM$^+$	2	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-
	Non-T OKM$^-$	2	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
	T OKM$^+$	1	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-
	T OKM$^-$	1	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-
	T Leu9$^+$	1	-	-	-	-	-	-	-	85	-	-
	T Leu9$^-$	1	82	51	29	-	14	8	-	15	2	-
	T T4,8$^+$	1	-	-	-	80	-	-	-	-	-	-
	T T4,8$^-$	1	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
Kontrollen,KM	KM	4	36	20	18	-	12	27	9	34	8	36
	T	4	70	44	25	-	8	23	8	72	2	28
	Non-T	4	3	1	2	-	18	70	20	5	35	36
	Non-T OKM$^+$	1	-	-	-	-	-	90	-	-	-	-
	T Leu9$^+$	3	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-
	T Leu9$^-$	2	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
	T T4,8$^+$	1	-	-	-	60	-	-	-	-	-	-
	T T4,8$^-$	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
S.T.	PBL	1	60	36	22	-	-	-	-	-	12	-
	T	1	85	55	28	-	-	-	-	-	4	-
B-CLL	PBL	1	6	-	-	-	-	4	-	-	70	85
	T	1	25	-	-	-	-	-	-	-	40	-
	Non-T	1	1	-	-	-	-	-	-	-	90	-
	Ad.Z.	1	-	-	-	-	-	7	-	-	94	-
	Non-T Ad.Z.$^-$	1	0	-	-	-	-	0	-	-	50	74

Legende:

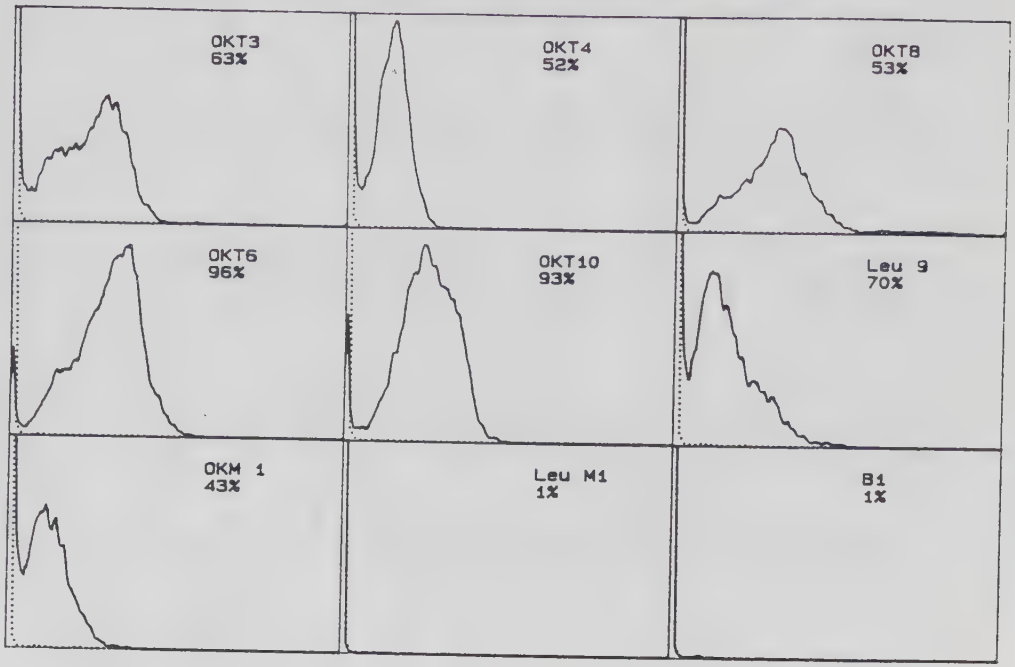
S.T. : Solide Tumoren

Ad.Z.: Adhärente Zellen

n : Anzahl der Personen

Angabe der positiven Zellen in %; bei n > 1 Angabe des Mittelwerts

Abb.9 Markeranalyse von Zellen aus einem Thymom mit dem Zellsorter



Legende

Negativkontrolle der Immunfluoreszenz (unterbrochene Linie): irrelevanter Kontroll-Antikörper
X-Achse: Fluoreszenzintensität; y-Achse: Zellzahl

Tab. 21 Einfluß von myeloischen Zellen auf die IFN-Produktion und Proliferation

		MEDIUM	PHA	PWM	TPA + PHA
PBL	IFN	0	234	234	234
	Prolif.	7.000	121.000	19.000	26.000
PBL +1.)	IFN	14	160	130	243
	Prolif.	83.000	145.000	85.000	43.000
PBL +2.)	IFN	13	> 729	390	390
	Prolif.	12.000	184.000	37.000	59.000
T	IFN	0	216	88	702
	Prolif.	7.000	131.000	38.000	67.000
T + 1.)	IFN	16	729	370	> 729
	Prolif.	100.000	229.000	92.000	139.000
T + 2.)	IFN	16	390	340	340
	Prolif.	18.000	260.000	47.000	144.000
T $T4,8^+$	IFN	0	16	81	420
	Prolif.	10.000	131.000	68.000	39.000
T $T4,8^+$ + 1.)	IFN	390	729	130	> 729
	Prolif.	93.000	265.000	105.000	129.000
T $T4,8^+$ + 2.)	IFN	16	> 729	> 729	> 729
	Prolif.	32.000	237.000	69.000	162.000
KM (AML) allein	IFN	5	36	14	46
	Prolif.	83.000	104.000	72.000	3.000
PBL(AML) allein	IFN	3	140	43	140
	Prolif.	10.000	8.000	4.000	7.000

Legende:

siehe Tab. 19

1.) : Zusatz von 30 % KM-Zellen eines AML-Patienten mit dem Phänotyp 10 % OKM^+, 20 % Leu $M1^+$, 8 % $OKT3^+$, d.h.
Zusatz von 3 % OKM^+ und 6 % Leu $M1^+$ malignen KM-Zellen

2.) : Zusatz von 30 % PBL eines AML-Patienten mit dem Phänotyp 50 % OKM^+, 20 % Leu $M1^+$, 18 % $OKT3^+$, d.h.
Zusatz von 15 % OKM^+ und 6 % Leu $M1^+$ malignen PBL

3.5. Qualitative Analyse des von PBL oder KM-Zellen gebildeten Interferons

Soweit es von der Menge her möglich war, wurden Überstände von 4 Tage alten Kulturen aus peripheren Blutlymphozyten oder Knochenmarkzellen auf ihren Interferonsubtyp hin untersucht. Dies erfolgte in Neutralisationsassays mit Hilfe von gegen humane Interferone gerichteten monoklonalen Antikörpern aus dem Kaninchen, wie unter 2.7.2. beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt:
Unterschiedliche Zellfraktionen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark von gesunden Spendern produzierten nach Stimulation mit PHA, PHA plus TPA, Interleukin-2 oder MAS überwiegend γ-Interferon; in Überständen aus OKM-positiven T-Zellen aus dem PB und aus Non-T-Zellen aus dem KM wurde nach Stimulation mit PHA neben γ-IFN auch α-IFN festgestellt.

Die peripheren Blutzellen eines Patienten mit c-ALL sowie die peripheren und aus dem Knochenmark stammenden Zellen von 2 unterschiedlichen Patienten mit AML produzierten nach Induktion mit PHA oder PHA plus TPA sowohl γ- als auch α-Interferon; nach Zugabe von Interleukin-2 oder MAS befand sich dagegen vor allem γ-Interferon im Zellkulturüberstand.

Tab. 22 Qualitative Interferonanalyse im LTT bei gesunden Personen und Leukämiepatienten

	Zellfraktion	IFN-Induzent	IFN-Subtyp
Kontrollen, PBL	T Leu 9^+	PHA, PHA plus TPA, IL-2, MAS	IFN-γ
	T $Leu9^-$	PHA, PHA plus TPA, IL-2, MAS	IFN-γ
	T $T4,8^+$	PHA, PHA plus TPA, IL-2	IFN-γ
	T OKM^+	PHA IL-2	IFN-γ, IFN-α IFN-γ
	T OKM^-	PHA, IL-2	IFN-γ
Kontrollen, KM	Gesamt	PHA, IL-2	IFN-γ
	T	PHA	IFN-γ
	Non-T	PHA	IFN-γ, IFN-α
	T Leu 9^+	PHA	IFN-γ
	T $T4,8^+$	PHA, PHA plus TPA, IL-2, MAS	IFN-γ
	T $T4,8^-$	PHA	IFN-γ
C-ALL	PBL	PHA, PHA plus TPA, IL-2, MAS	IFN-γ, IFN-α IFN-γ
AML	PBL	PHA, PHA plus TPA, IL-2, MAS	IFN-γ, IFN-α IFN-γ
AML	KM	PHA, PHA plus TPA	IFN-γ, IFN-α

Legende:

Kulturen aus PBL oder KM-Zellen wurden 4 Tage lang stimuliert mit: PHA 1 µg/ml; TPA 7 ng/ml; IL-2 1:7; MAS 1:35

Die Neutralisations-Assays wurden ausgeführt mit Kaninchen-AK gegen humanes IFN-α und -γ.

4. DISKUSSION

4.1. Interferonproduktion und Lymphoproliferation in der Gemischten Lymphozytenkultur (MLC)

Die Interaktion zwischen kokultivierten Zellen in der MLC führt zu einer Aktivierung unterschiedlicher Effektorfunktionen, v.a. zur Aktivierung von zytotoxischen Killer-Zellen, zur Proliferation von T-Zellen und zur Induktion von γ-Interferon. Die MLC stellt ein in vitro-Modell für die Transplantatabstoßung dar, und es ist nicht geklärt, ob die Bildung von IFN-γ in diesem System einen direkten Einfluß auf die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten ausübt.
Im Menschen wurde eine IFN-Produktion in der allogenen (6 ,151) und auch in der autologen MLC (AMLC, 9) beschrieben, letzteres konnte von anderen (118) nicht bestätigt werden.

Um möglichst hohe IFN-Titer zu erreichen, wurden die Versuchsbedingungen in der autologen und allogenen MLC optimiert: als bestes Medium erwies sich M199 plus 2-5% AB-Serum; maximale Interferontiter wurden an Tag 7, maximale Proliferationswerte an Tag 8 gemessen. Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Perussia (151), der ein IFN-Maximum an Tag 5 zeigte und von Andreotti (6), der je nach eingesetzter Zellzahl ein IFN-Optimum an Tag 3-4 oder aber ein Plateau von Tag 3 bis 7 erhielt. Diese Differenzen in der Kinetik der Messung des Maximal-Interferons sind evtl. begründet in den unterschiedlichen Kulturbedingungen (Zellzahl, Medium etc.).

Bei dem in den Zellüberständen gemessenen Interferon handelte es sich vorwiegend um IFN-γ. Generell wurde in der allogenen und autologen MLC eine gute Proliferation induziert, höhere IFN-Titer (> 10 Einheiten) zeigten sich nur in der allogenen, nicht aber in der autologen MLC. Dies stimmt überein mit den Daten von Manger (118), nicht aber mit denen von Argov (9), der in der AMLC auch höhere IFN-Konzentrationen beschrieb.

In eingeschränktem Maße konnten Familienstudien durchgeführt werden, die eine Stimulation der γ-Interferon-Bildung in der humanen Gemischten Lymphozytenkultur durch HLA-Antigene demonstrierten: in Kokulturen von Lymphozyten HLA-identischer Zwillinge wurde kein IFN gemessen; in Antwort auf Differenzen in der HLA-A, -B, -C und -DR-Region dagegen wurde von einem Zwilling in jedem Fall (5-7 Einheiten), vom anderen Zwilling in keinem Fall Interferon produziert. Die Ursache für diese Unterschiede konnte nicht geklärt werden; da nur geringe Mengen IFN induziert wurden und es sich nur um eine Studie handelte, sind die bei den Zwillingen gefundenen Differenzen möglicherweise experimentell bedingt und liegen in der Schwankungsbreite des biologischen Testsystems. Die Daten mit dem IFN-produzierenden Zwilling sind in Einklang mit denen von Landolfo (106), der eine Stimulation der IFN-Produktion in der MLC durch die K-, D- und I-Regionen des H-2-Komplexes der Maus aufzeigte.
Zwischen der Interferon-Bildung und der Proliferation in der MLC wurde keine Korrelation festgestellt, was von anderen Arbeitsgruppen (6 , 9) bestätigt wurde.

Wie schon erwähnt, unterlagen die Interferon-Titer der unterschiedlichen MLC-Ansätze einer großen Schwankungsbreite. Dadurch und durch die vor allem in der autologen MLC resultierenden sehr geringen IFN-Konzentrationen wurde die Standardisierung der humanen Gemischten Lymphozytenkultur sehr erschwert. Die MLC schien daher zur Darstellung von Unterschieden in der IFN-Produktion nicht geeignet zu sein. Es wurde folglich von der MLC abgegangen und ein anderes Testsystem etabliert, mit dessen Hilfe die mitogen-induzierte Lymphoproliferation parallel zur Interferonproduktion gemessen werden kann.

4.2. Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Lymphoproliferation im Vollbluttest und im Lymphozytentransformationstest

Die Stimulation von Lymphozyten durch Mitogene stellt ein mögliches Testsystem zur Abschätzung der Immunreaktivität dar. Um diese im klinisch-immunologischen Labor gut bestimmen zu können, wurde ein Vollbluttest (VBT) zur Messung der mitogeninduzierten Interferonproduktion (94) ausgeweitet auf die Bestimmung der Lymphoproliferation, standar-

disiert und verglichen mit dem herkömmlichen Lymphozytentransformationstest (LTT), bei dem isolierte periphere Blutlymphozyten eingesetzt werden (46). Ähnliche Testsysteme im Vollblut sind von Junge (87) und Pauly (149) beschrieben.

Der Vollbluttest ist einfach und schnell durchzuführen, es werden nur kleine Blutmengen benötigt (in der Klinik ein großer Vorteil), und die in vivo vorhandenen zellulären und humoralen Blutbestandteile bleiben in ihrer Zusammensetzung unverändert.

Für den Test wurde heparinisiertes Vollblut optimalerweise 1:10 mit Medium 199 verdünnt und, unter Beibehaltung des autologen Plasmas, kultiviert. Die Verwendung von autologem Plasma im Vollbluttest bewirkte im Vergleich zu allogenem Serum sowohl gesteigerte Proliferation als auch Interferonproduktion. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Proliferation wurden auch von Junge (87) beschrieben. Die in den Kulturen vorhandene Lymphozytenzahl wurde mit Hilfe eines Differentialblutbilds vom Versuchstag im nachhinein rechnerisch ermittelt. - Für den Lymphozytentransformationstest hat sich der Zusatz von allogenem AB-Serum zu den Kulturen von $1x10^5$ oder besser $2x10^5$ PBL pro Kavität bewährt. Zeitkinetiken zeigten eine optimale Interferonproduktion im VBT an Tag 4 und im LTT an Tag 4-5. Kirchner (94) dagegen fand nach 24-stündiger Kulturdauer höhere IFN-Titer als nach 36 Stunden. Höchste Proliferationswerte wurden im VBT wiederum an Tag 4 und im LTT an Tag 3-4 ermittelt. Die Interleukin 2-Produktion im Vollbluttest hatte ihr Optimum wie im LTT an Tag 2, war aber deutlich geringer als im LTT.
Bei Einsatz vergleichbarer Zellzahlen im VBT und LTT zeigte sich die Interferonproduktion im Vollblut bei Stimulation mit den Mitogenen PHA, PWM und ConA 4- bis 10-fach erhöht gegenüber dem LTT ($\alpha < 0,01$); die Proliferation war im VB-Test nach PHA- und ConA-Induktion signifikant erhöht ($\alpha < 0,05$ für PHA und $< 0,01$ für ConA), in Antwort auf PWM dagegen war sie in beiden Systemen vergleichbar.

- Die Möglichkeit, daß die erniedrigte Interferonproduktion im LTT durch Anreicherung von supprimierenden Monozyten bei der Dichtegradiententzentrifugation zustande kommt, wurde weitgehend ausgeschlossen: die Depletion Eisen-phagozytierender Zellen erniedrigte sowohl die proliferative Antwort als auch die Interferonbildung. Eine andere Möglichkeit, daß im VB-Assay neben γ-Interferon z.B. auch α-Interferon vorhanden sein könnte,ist unwahrscheinlich, da das IFN in den Überständen der VB-Kulturen als IFN-γ identifiziert wurde. Eine ursächliche Erklärung für die gesteigerte Interferonproduktion und Proliferation im Vollbluttest konnte nicht gefunden werden.

Wie kürzlich gezeigt wurde, haben monoklonale anti-T Zell-Antikörper wie OKT3 mitogene Eigenschaften (198) und induzieren auch Interferon (31,202). Bei Einsatz von anti-Leu 4 als Mitogen im VBT und LTT wurden in Abhängigkeit von den getesteten Individuen unterschiedliche Ergebnisse erzielt; nur 50-60% der gesunden Blutspender zeigten Lymphoproliferation und/oder Interferonproduktion. Dies war sowohl im VB-Test als auch im LTT festzustellen; die Ergebnisse waren reproduzierbar und unabhängig von der Antwort auf andere Stimuli wie etwa PHA. Ferner war die Markeranalyse bezüglich der T3- und Leu4-Antigene auf den T-Zellen bei allen Donoren vergleichbar. Diese Ergebnisse sind in Einvernehmen mit Daten von Kaneoka (90), der eine individuell unterschiedliche Antwort auf anti-Leu 4 beschrieb. Tax (184) zeigte Reaktivität in allen Fällen bei Gebrauch von IgG_{2a}-Antikörpern (wie z.B. OKT3), dagegen bei 30% der getesteten Individuen keine Antwort auf IgG_1-Antikörper (wie z.B. anti-Leu 4). - Bei Einsatz von OKT3 in unseren Systemen war im LTT (mit $1x10^5$ PBL pro Kavität) bei allen, im VB-Test dagegen nur bei 60% der getesteten Spender Proliferation zu beobachten. Die Gründe für diese Differenzen in der proliferativen Antwort auf OKT3 in beiden Testsystemen sind unklar; eine Erklärung wäre evtl. eine erhöhte Monozytenanzahl bei den mit Lymphoprep isolierten PBL. - Bezüglich der Interferon-Aktivität nach Induktion mit OKT3 oder anti-Leu 4 waren 50-70% der untersuchten Individuen „low responder". Der Grund dafür mag eine individuelle Heterogenität der Spender sein, welche von polymorphen Monozytenfunktionen (90) abhängt, die evtl. auf der Stufe der mit dem murinen IgG_1 reagierenden Fc-Rezeptoren entstehen (184).

Eine Induktion der Interferonproduktion im murinen und humanen System durch das Mitogen MAS aus dem Überstand von Mycoplasma arthritidis-Kulturen wurde zuerst von Cole (34) beschrieben. Im Gegensatz zum LTT zeigte MAS bei Einsatz im Vollbluttest keine mitogenen Eigenschaften: weder Proliferation noch IFN-Produktion wurden festgestellt. Eine mögliche Erklärung dafür wären eventuell auftretende, aber durch die im VBT in geringen Mengen vorhandenen Lymphozyten sehr niedrige und daher unter der Nachweisgrenze liegende Antworten.

Die mitogeninduzierte Interferonproduktion kann durch den Zusatz von Phorbolestern gesteigert werden (217,219). Der Tumorpromotor TPA allein induzierte in unseren Händen im LTT kein Interferon und nur eine geringe Proliferation, in Verbindung mit PHA jedoch zeigten sich maximale Interferontiter und Proliferationswerte. Dieser bei der mitogeninduzierten T-Zell-Aktivierung vorhandene Verstärkungseffekt von TPA resultiert aus der strukturellen Ähnlichkeit mit 1,2-Diazylglyzerol (193) und der Fähigkeit, die Lymphokine Interleukin-1 und -2 zu ersetzen (83).

Eine mögliche Anwendung des Vollbluttests bei der Untersuchung immundefekter Patienten wurde im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv an 5 unterschiedlichen Patientengruppen (an Patienten mit Morbus Hodgkin, Plasmozytom, kolorektalen Tumoren, Primär-Chronischer Polyarthritis oder dem AIDS-Related Complex) erprobt.
Aus diesen Versuchen resultierte im VB-Assay sowohl bei den Kontrollspendern als auch bei den Patienten eine geringere Proliferation als im LTT. Dies war bei den zuvor untersuchten Blutspendern nicht der Fall und demonstriert die Empfindlichkeit des VB-Tests gegenüber Schwankungen in den Kulturbedingungen während der Inkubationsdauer: CO_2-Gehalt und Luftfeuchtigkeit müssen konstant bleiben; dies ist bei Einsatz fein geregelter feuchter Brutschränke gut erreichbar.
Die in den Vollblutkulturen gemessenen Interferon-Titer waren sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Patienten erhöht bis vergleichbar mit den Daten im LTT. Die mitogen-induzierte Interleukin 2-Produktion

war bei den gesunden Spendern und den meisten Patienten im VB-Test niedriger als im Lymphozytentransformationstest, was auf die in den Vollblutkulturen vorhandenen geringen Zellzahlen zurückzuführen ist. Bei allen Personen wurde die stärkste IL 2-Konzentration im LTT nach PWM-Stimulation und im VB-Test nach PHA-Induktion gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, daß der schnell durchzuführende und geringe Blutmengen beanspruchende Vollblut-Test gut geeignet ist, um bei unterschiedlichsten Patientenkollektiven den Immunstatus bezüglich der mitogeninduzierten Interferonproduktion, Proliferation und auch Interleukin 2-Produktion zu untersuchen.
Aufgrund der geringen Zahl an eingesetzten Lymphozyten sind die Einzelergebnisse im Vollbluttest häufig niedriger als im LTT; die Reaktivität der Patienten muß daher, wie es zum Ausgleich von Schwankungen bei allen biologischen Assays durchgeführt wird, immer im Vergleich zur Antwort der mitgeführten gesunden Kontrollpersonen interpretiert werden.

4.3. Interferonproduktion durch mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark; Vergleich mit der Interleukin 2-Produktion und der Proliferation

Die Produktion von Lymphokinen, v.a. von Interferon-γ, wurde bisher in humanem Knochenmark wenig untersucht. Es gibt Berichte über die Interferonbildung durch Knochenmarkzellen bei Kindern mit akuter Leukämie, Lymphosarkom und Morbus Hodgkin (142,143), aber meines Erachtens keine Information über die Kapazität des gesunden Knochenmarks zur IFN-Produktion.

4.3.1. Untersuchung an gesunden Blutspendern

Die durchgeführten Untersuchungen, die sich auf das periphere Blut von 65 und das Knochenmark von 10 gesunden Spendern beziehen, umfassen die mitogeninduzierte Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Lymphoproliferation. Sie ergaben im PB als auch im KM Lymphokinbildung und Tritiumthymidin-Einbau. Auffällig waren im Vergleich zum PB teilweise erhöhte IFN-Titer im KM; die IL 2-Produktion war im KM verringert, was aufgrund der geringen Anzahl an getesteten Personen jedoch nicht repräs-

sentativ ist. Maximale IFN- und IL 2-Titer wurden mit PWM erzielt, maximale Proliferation mit PHA gemessen. - Die mitogeninduzierte antivirale Aktivität im KM bestand, wie im PB, vorwiegend aus γ-Interferon. Die Ergebnisse zeigen, daß gesundes Knochenmark, welches neben reifen viele unreife Zellen enthält, ähnlich wie das periphere Blut in der Lage ist, in vitro Interferon und Interleukin-2 zu bilden. Mögliche Erklärungen für die gefundene gesteigerte IFN-Produktion im KM wären geringere Mengen an supprimierenden Faktoren oder aber eine in vivo-Aktivierung der KM-Zellen. - Für die letzte Annahme spricht möglicherweise ein Bericht von Martinez-Maza (121), der im peripheren Blut neugeborener Kinder, welches ähnlich dem KM unausgereifte Immunozyten enthält, eine höhere Frequenz spontan γ-IFN-sezernierender Zellen fand als bei Erwachsenen; bei diesen Zellen handelte es sich v.a. um T-Helferzellen. Auch enthielten die mononukleären Zellen der Neugeborenen häufiger zytoplasmatisches IFN-γ (3,5%) als die Adulten (1%). Martinez-Maza nahm an, daß diese Zellen in vivo aktiviert wurden und eine Rolle spielen bei antiviralen oder Lymphokin-Aktivitäten. Im Gegensatz zu dieser erhöhten spontanen γ-IFN-Sekretion liegen Daten über einen Defekt in der mitogeninduzierten γ-IFN-Produktion bei Neugeborenen vor: Nabelschnurlymphozyten bildeten im Vergleich zu den Lymphozyten Erwachsener nur in sehr geringen Mengen γ-IFN (129,185,206,207). Wakasugi und Mitarbeiter (206,207) fanden eine gesteigerte Empfindlichkeit der Nabelschnurzellen gegenüber endogen in normalen Mengen produziertem Prostaglandin E und vermuten eine Fehlregulation im Blut der Neugeborenen. Taylor et al. (185) führten die defekte PHA-induzierte γ-IFN-Bildung auf funktionell unreife Makrophagen in den Neugeborenen zurück: die Kombination von Nabelschnur-T-Lymphozyten mit Makrophagen von Erwachsenen ergab in ihren Händen eine gesteigerte Interferonproduktion, was von Wakasugi (206) nicht festgestellt wurde. - Die Fähigkeit zur γ-IFN-Bildung steigt mit dem Alter der Kinder an und ist erst bei Dreijährigen im Vergleich zu Erwachsenen voll ausgebildet (129).

Im Gegensatz zur Kapazität der IFN-Produktion ist die Fähigkeit zur Bildung von Interleukin-2 im Neugeborenen und Kleinkind vollständig ausgereift (129,207), was eher gegen einen Defekt in der Makrophagenfunktion spricht.

Eine Korrelation zwischen der Produktion von IFN-γ und IL-2 wurde beschrieben - sie äußert sich z.B. in gleichmäßig ansteigenden Titern beider Lymphokine nach Phorbolestergabe zusätzlich zu einem Mitogen (138). Die bei den eigenen Untersuchungen entstandenen Lymphokin-Titer ließen sich jedoch nicht in dem Maße korrelieren, daß eine Regressionsgerade zustandekam. Um eine solche zu erhalten, wäre evtl. eine Messung der zu demselben Zeitpunkt vorhandenen Lymphokine notwendig; in unserem System wurden die Zellüberstände an den jeweils optimalen Tagen (Tag 2 für IL-2 und Tag 4 für IFN-γ) auf ihren Lymphokingehalt hin untersucht.

Im erwachsenen Menschen und auch in der Maus scheinen Interleukin-2 und γ-Interferon ihre Produktion gegenseitig zu regulieren: IFN-γ läßt sich durch IL-2 auch in Abwesenheit von Mitogen induzieren, wie aus den eigenen Daten mit PB- und KM-Lymphozyten und beispielsweise auch aus einem Bericht von Kasahara (93) hervorgeht. Interferon-γ seinerseits erhöht die Anzahl der IL 2-Rezeptoren auf Lymphozyten (84) und verstärkt die IL 2-Bildung in PHA-stimulierten mononukleären Zellen (201).

Eine Korrelation zwischen der Interferonproduktion und der Proliferation, gemessen als Tritiumthymidin-Einbau, war bei den mitogenstimulierten Lymphozyten aus PB und KM nicht festzustellen. Obwohl gute IFN-Induzenten häufig auch gute Mitogene sind, ist die DNA-Synthese keine obligatorische Notwendigkeit für die Produktion von Gamma-Interferon (21).

Im Gegensatz zu einem Bericht von Gillis (62) fanden wir auch keine Korrelation zwischen Interleukin 2-Produktion und mitogeninduzierter Lymphoproliferation. Die eigenen Daten sind in Einvernehmen mit denen von Neefe (137) und Koch (102), die eine Dissoziation zwischen IL 2-Bildung und PHA-induzierter Proliferation beschrieben.

4.3.2. Untersuchung an Tumorpatienten

Kombinierte Defekte in der Immunregulation, z.B. in der Interferonproduktion (73) oder in der natürlichen Killerzell-Aktivität (91), scheinen bei Tumorpatienten ursächliche Faktoren für die geringe Abwehr gegen wachsende Tumoren zu sein; bei Leukämien z.B. sind sehr unterschiedliche Zellen in den malignen Prozeß involviert, wodurch neben den generellen Zellfunktionen auch die immunologischen Funktionen verändert und beeinträchtigt sind. Der Immunstatus der Patienten kann dabei in Abhängigkeit vom klinischen Stadium (akute Phase, chronische Phase, Remission) variieren.

4.3.2.1. Patienten mit soliden Tumoren

Bei Untersuchung der mitogeninduzierten Interferonproduktion zeigten die Patienten mit soliden Tumoren (v.a. des Kolorektums und der Mamma) im Vergleich zu gesunden Individuen unsignifikant erniedrigte IFN-Titer, leicht erhöhte IL 2-Titer und signifikant reduzierte Proliferationswerte. Andere Untersuchungen erbrachten, daß Patienten mit kolorektalen Tumoren trotz eines Defekts in der T-Zell-Proliferation in der Lage sind, ähnlich wie ein Kontrollkollektiv nach Mitogenstimulation IFN zu bilden (133). Andererseits wird von DeBoen (37) bei dieser Patientengruppe eine verminderte NK-Zell-Aktivität beschrieben, welche, da Interferon NK-Zellen aktiviert, aus einer reduzierten IFN-Sekretion resultieren könnte. Der Grund für die differierenden Befunde bezüglich der Interferonproduktion könnte an unterschiedlichen Tumorstadien der untersuchten Patienten liegen, - bei den Daten von Müller (133) war im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen eine Korrelation der IFN-Bildung mit dem Krankheitsstadium vorhanden. In beiden Fällen konnte nur eine begrenzte Anzahl an Personen getestet werden; möglicherweise stellt sich erst bei Untersuchung eines größeren Kollektivs von Tumorpatienten heraus, ob hier ein Defekt in der mitogeninduzierten IFN-Bildung vorliegt.

Die untersuchten Tumorpatienten zeigten eine leicht (unsignifikant) erhöhte Produktion von Interleukin-2. Andere Untersuchungen (102) erbrachten normale bis verminderte IL 2-Titer nach Mitogenstimulation, wobei v.a. Patienten mit Metastasen unsignifikant weniger IL-2 produzierten als jene mit lokalisierter Krankheit. Diese Unterschiede konn-

ten bei den selbst untersuchten Patienten nicht gefunden werden. Die Ursache für die voneinander abweichenden Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Kulturbedingungen (wie Kulturdauer und Assay zur Bestimmung der IL 2-Aktivität) liegen. - Da keine Korrelation zwischen der jeweiligen IL 2-Produktion und dem Tumorstadium festgestellt wurde, bleibt offen, ob die abweichende mitogeninduzierte IL 2-Bildung bei einem Teil der Patienten mit soliden Tumoren von klinischer Bedeutung ist.

Die gefundene reduzierte proliferative Antwort der PBL von Tumorpatienten auf Mitogene bestätigte Santos (168), die darüberhinaus bei dieser Patientengruppe eine signifikant verringerte Interleukin 1-Produktion und eine durch erhöhte Bildung von Prostaglandin E_2 vermittelte verstärkte Suppressorzellaktivität fand: nach Depletion der Monozyten, die das die IL 2-Sekretion hemmende Prostaglandin sezernieren (157), stieg die Lymphoproliferation wieder an. - In früheren eigenen Untersuchungen (45) wurde bei Patienten mit kolorektalen Tumoren ebenfalls eine erhöhte spontane Suppressorzellaktivität festgestellt, allerdings fanden wir keine erhöhten Spiegel an Prostaglandin E. - Ob verminderte T-Zell-Proliferation und gesteigerte Suppressoraktivität Faktoren sind, die zur Ausbildung von Tumoren führen, oder aber Reaktionen des Immunsystems auf kolorektale Tumor-Antigene darstellen, ist ungeklärt.

4.3.2.2. Patienten mit nicht-leukämischen hämatologischen Erkrankungen

Die Untersuchung an Patienten mit Plasmozytom und Morbus Waldenström zeigte ebenso wie die an Patienten mit soliden Tumoren eine Reaktion nicht-maligner peripherer Blutzellen auf den im Körper vorhandenen Tumor. Festgestellt wurde im Vergleich zu den gesunden Kontrollspendern eine (nicht signifikant) gesteigerte Interferonproduktion, aber erniedrigte Interleukin 2-Titer und signifikant verringerte Lymphoproliferationswerte. Bei Untersuchung eines Patienten mit benigner Paraproteinämie dagegen waren die Reaktionen vergleichbar mit denen der gesunden Personen. - Bei der vergleichenden Untersuchung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark derselben Personen resultierten bei je einem Patienten mit Plasmozytom und mit M. Waldenström

im „entarteten" KM geringere IFN-Titer und Proliferationswerte als im „gesunden" peripheren Blut. Unklar ist, ob die reduzierte IFN-Produktion ursächlich ist oder nur eine Folgeerscheinung darstellt bei der malignen Entartung.

Ozer (146) berichtete von einer Suppressoraktivität in PBL von Myelompatienten, die vorwiegend durch phagozytierende mononukleäre Zellen, nicht aber durch T-Lymphozyten vermittelt wurde. Bei Untersuchung von isolierten T-Zellen derselben Patientengruppe fand er eine normale Helferaktivität für B-Zellen. Mit einer erhöhten Suppressoraktivität der Monozyten wäre auch die gefundene erniedrigte IL 2-Produktion und Zellproliferation im peripheren Blut von Patienten mit malignen Paraproteinämien zu erklären.
Zu dem in Myelompatienten vorliegenden Defekt in der polyklonalen Immunglobulin-Synthese könnten Abnormalitäten der immunregulatorischen Zellen ebenso beitragen wie immunsupprimierende Produkte der expandierenden Tumorzell-Population.
Auffällig war bei dieser Patientengruppe ebenso wie bei den gesunden Personen und den Patienten mit soliden Tumoren eine fehlende Korrelation zwischen der Interferon- und Interleukin 2-Produktion: während die Patienten mit soliden Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt IFN, aber erhöht IL-2 bildeten, zeigten die Patienten mit malignen Paraproteinämien hohe IFN-, aber geringe IL 2-Aktivitäten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Aktivierung der γ-Interferon- und Interleukin 2-Produktion durch Mitogene zwar gleichzeitig erfolgen mag, daß aber die beiden Lymphokine nicht immer in sich entsprechenden Mengen gebildet werden.Die Regelkreise für die Interferon- und Interleukin 2-Bildung scheinen bei Tumorpatienten in unterschiedlichem Maße gestört oder aktiviert zu sein. Auch wurde gezeigt, daß bei gesunden Personen die Gene für IL-2 und γ-IFN nach Mitogenstimulation parallel aktiviert werden (132), daß jedoch nicht immer eine Korrelation zwischen der Menge an gebildeter m-RNA für Interleukin-2 und für γ-Interferon besteht (177).

4.3.2.3. Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL)

Im peripheren Blut von Patienten mit ALL vom T-Zell-Typ waren die mitogeninduzierten IFN-γ- und IL 2-Titer und die Proliferation im Vergleich zu gesunden Personen sehr stark reduziert oder gar nicht vorhanden; auch im Knochenmark eines Patienten war eine Reaktion genausowenig zu erkennen. Die Antwort der Patienten mit c-ALL war stärker als die der T-ALL-Patienten, jedoch signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollspendern. - Diese Ergebnisse zeigen die Reaktion von entarteten Zellen auf Mitogenstimulation, da bei Leukämiepatienten die malignen Zellen aus dem Knochenmark in die peripheren Blutbahnen ausgeschwemmt werden.

Die festgestellte reduzierte γ-IFN-Produktion nach Mitogenstimulation bei Patienten mit ALL ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen: Lazar (109) beschrieb bei ALL-Patienten mit Rückfall eine noch weitergehende Reduktion der γ-IFN-Bildung als bei Patienten in Remission (die virusinduzierte Bildung von α-IFN dagegen zeigte keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen); Orlova (143) fand bei Kindern mit ALL eine stark reduzierte IFN-γ-Produktion durch mononukleäre Zellen sowohl aus dem PB als auch aus dem KM, dagegen bei Kindern mit Lymphosarkom ohne KM-Beteiligung normale IFN-γ-Titer. Während Lazar keine Korrelation zwischen der Menge an gebildetem IFN und dem Stadium der Chemotherapie fand, stellte Orlova eine gute Übereinstimmung zwischen der γ-IFN-Antwort und der Kompensation des leukämischen Prozesses (Remission) fest und sah darin einen möglichen Hinweis auf die Unfähigkeit leukämischer Blasten zur Interferonproduktion.

Die stark verringerte mitogeninduzierte IL 2-Produktion und Proliferation bei Patienten mit T-ALL wurde auch von Vyth-Dreese (204) beschrieben, der feststellte, daß sich dieser Defekt nach zusätzlicher Stimulation mit TPA bei einem Teil der Patienten aufheben ließ - dies allerdings war bei den von uns untersuchten Patienten nicht der Fall.

Bei der mitogeninduzierten T-Zell-Aktivierung liefern Monozyten das Signal Interleukin-1, welches T-Helferzellen zur Produktion von Interleukin-2 anregt. Da die Zugabe von normalen, IL 1-produzierenden Monozyten die Proliferation der malignen Zellen auf PHA in seinen Untersuchungen nicht wiederherstellte, vermutete Vyth-Dreese keinen Defekt in Monozyten, sondern möglicherweise eine mangelnde Antwort der malignen Zellen auf IL-1. Der daraus entstehende Mangel in der IL 2-Produktion führte evtl. zu der verminderten T-Zell-Proliferation. - Venuta (199) zeigte bei Patienten mit T- und non-T-non-B-ALL nach PHA-Stimulation das Vorhandensein von IL-2, aber das Fehlen von Proliferation. Da sich teilende Zellen offensichtlich IL-2 verbrauchen, spiegelt die im Zellkulturüberstand gemessene IL 2-Aktivität die Differenz zwischen produziertem und konsumiertem Wachstumsfaktor wieder. Stimulation mit supraoptimalen Mitogendosen z.B. kann zu einer verringerten Proliferation, aber erhöhter IL 2-Ausbeute führen (204). Dies würde die häufig gemessenen Differenzen zwischen den Interleukin 2-Titern und Proliferationswerten erklären.

4.3.2.4. Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL)

Die Patienten mit entarteten reifen T- oder B-Zellen bei Chronischer Lymphatischer Leukämie oder bei einem Sézary-Syndrom zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern verringerte mitogeninduzierte Lymphokintiter und Wachstumsraten.

Eine eingeschränkte Proliferation und IL 2-Produktion bei Patienten mit T-CLL fand auch Vyth-Dreese (204). Diese mangelnde Reaktion auf Mitogene in den Zellpopulationen der Patienten könnte durch die Präsenz von T-Zellen erklärt werden, die bereits aktiviert sind und nicht auf eine Zweitstimulation in Form von Mitogenen antworten. Diese Zellen müßten bei ausreichender Versorgung mit IL-2 wachsen. Dies ist der Fall bei manchen reifen T-Zell-Neoplasien, die aktivierte T-Zellen enthalten: diese Zellen antworten direkt auf exogen zugefügtes Interleukin-2 (155). - Krajewski (103), Friedman (59) und Gramatzki (64) berichteten, daß T4-positive T-CLL-Zellen in der Lage sind, Interleukin-2 zu produzieren, was für T8-positive leukämische Zellen offensichtlich nicht zutrifft (103). Die Zellen des von uns untersuchten T-CLL Patien-

ten waren $T4^+$,$T8^+$ und bildeten kaum IL-2. Ebensowenig zeigte der Patient mit Sézary-Syndrom, welches gekennzeichnet ist durch das Auftreten von reifen, T3-, T11- und T4-positiven Sézary-Zellen, Interleukin 2-Produktion. Ähnliches berichtete auch Solbach (175), der eine IL 2-Bildung bei Sézary-Patienten nur nach Induktion mit TPA oder TPA plus PHA, nicht aber mit PHA alleine erhielt. Bei dem von uns untersuchten Patienten war eine Erhöhung der IL 2-Produktion durch einen synergistischen Effekt von PHA plus TPA nicht festzustellen; auch Jemma (81) fand nach Stimulation mit PHA plus TPA bei Sézary-Patienten kaum IL 2-Produktion und signifikant geringere γ-Interferon-Titer als bei Kontrollpersonen. - Obgleich die Autostimulation durch IL 2-produzierende und darauf antwortende Zellen in manchen Fällen eine Rolle bei der Proliferation leukämischer Zellen in vivo spielen mag, ist sie wahrscheinlich nicht ursächlich bei der Induktion der T-Zell-Neoplasie beteiligt (103). Die von uns untersuchten CLL-Patienten produzierten spontan kein und nach Mitogeninduktion wenig γ-Interferon - von ähnlichen Daten berichtete auch Ozer (146). Hooks (73) dagegen beschrieb, daß Lymphozyten eines CLL-Patienten, welche zu über 95% aus T3-, T4-negativen und T8-, Fcγ-positiven Zellen bestanden, im Gegensatz zu lymphoiden Zellen von normalen Individuen und von Patienten mit anderen malignen lymphoiden Erkrankungen in vitro spontan γ-Interferon produzierten. Ähnliches fand Itoh (80), der bei einem CLL-Patienten mit den NK-Zellen ähnelnden Lymphozyten (LGL, $SRBC^+$, $T3^+$, $T8^+$, $HNK1^+$, $Fc\gamma^+$) neben NK-Zell-Aktivität ebenfalls spontane IFN-γ-Bildung feststellte. Diese Ergebnisse zeigten, daß HNK1-positive leukämische Zellen bei der Induktion der γ-IFN-Produktion involviert waren; es ist jedoch ungeklärt, ob in diesen Fällen die malignen Zellen oder verbleibende normale T-Zellen die Produzenten von Interferon darstellten.

4.2.3.5. Patienten mit Myeloischen Leukämien

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) wird charakterisiert durch die Proliferation maligner Myeloblasten oder anderer unreifer myeloischer Zellen. Die Infiltration des Knochenmarks durch diese leukämischen Zellen verhindert eine normale Hämatopoese; die Folgen sind Anämie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie und häufig zum Tod führende Infektionen.

Die untersuchten Patienten mit AML zeigten in vitro (als einziges Kollektiv) im peripheren Blut, nicht aber im Knochenmark eine spontane Interferonproduktion; nach Mitogenstimulation waren die IFN-Titer im PB und KM ähnlich und im Vergleich zu den Kontrollpersonen nur leicht erniedrigt. Die mitogeninduzierte Interleukin 2-Produktion entsprach im PB und KM der der gesunden Spender. Die Zellproliferation der PBL der AML-Patienten war signifikant reduziert, während die KM-Zellen spontan proliferierten, was durch Mitogene nur leicht gesteigert werden konnte.

Periphere Blutlymphozyten von Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML), bei denen vorwiegend die reifen Granulozyten maligne entartet sind, bildeten nur nach Mitogenstimulation sehr viel Interferon, aber wenig Interleukin-2.Weiter zeigten sie spontan eine hohe DNA-Synthese, die durch Mitogene teilweise erhöht, teilweise aber auch reduziert wurde. Befanden sich die CML-Patienten in Blastenkrise, d.h. in einer durch die Vermehrung unreifer Zellen gekennzeichneten akuten Krankheitsphase, bildeten die PBL nach Mitogeninduktion wenig IFN und IL-2. Dem standen sehr hohe spontane und mitogenstimulierte Proliferationswerte gegenüber.

Eine spontane DNA-Synthese peripherer mononukleärer Zellen bei Patienten mit akuter und chronischer myeloischer Leukämie wurde auch von Kaneoko (91) beschrieben. Er fand diese Spontanproliferation bei Patienten in akuter Phase, nicht aber bei Patienten in Vollremission. Die mitogeninduzierte DNA-Synthese war sowohl bei AML- als auch bei CML-Patienten verringert. - Die spontan auftretende Proliferation bei Leukämiepatienten läßt vermuten, daß diese mononukleären Zellen mit normaler Morphologie funktionell abnormal sind, ähnlich den Zellen, die sich in einem präleukemischen Stadium befinden: auch die PBL der meisten HTLV I (Human T cell Leukemia Virus) I-Träger zeigen z.B. eine erhöhte spontane DNA-Synthese ohne gleichzeitige maligne Transformation (91).

Die in AML-Patienten festgestellte spontane Interferonproduktion könnte durch eine in vivo-Aktivierung der verbliebenen T-Zellen durch Tumorzellantigene erklärt werden, ebenso besteht die Möglichkeit, daß die in großen Mengen auftretenden malignen myeloischen Zellen als „accessory cells" die IFN-Bildung unterstützen, oder daß sie sogar selbst in der Lage sind, Interferon zu produzieren.

Untersuchungen an leukämischen Zellinien zeigten, daß humane lymphoblastoide B-Zellinien und Myeloblasten-Linien sowohl spontan als auch nach Induktion mit Sendai-Virus IFN-α/β bilden können (2 , 53, 75,110,122). Die Produktion von IFN-γ oder IL-2 dagegen wurde nur in humanen leukämischen T-Zellinien wie Jurkat und in Linien vom non-T-non-B-Zelltyp beschrieben (5 , 58).

4.4. Fähigkeit von Subpopulationen aus peripherem Blut und Knochenmark zur Interferon- und Interleukin 2-Produktion

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Phänotypen der Zellen näher zu bestimmen, die in frisch angelegten Kulturen mononukleärer Zellen von gesunden Spendern oder Patienten in der Lage sind, Interferon-γ zu bilden.

4.4.1. B-Zellen

Die mittels Rosettierung mit Schafserythroyzten und monoklonalen Antikörpern erhaltenen peripheren B-Zellen (Non-T OKM^--Fraktion) gesunder Donoren produzierten nach Mitogenstimulation kein Interferon.
Im gesunden Knochenmark konnte die entsprechende Zellfraktion nicht untersucht werden; die Non-T-Zellen aus dem KM bildeten geringe Mengen an IFN-γ und kein IL-2. - Gesunde periphere Non-T-Zellen von Patienten mit soliden Tumoren zeigten ebensowenig Lymphokinproduktion wie maligne periphere B-Zellen (von adhärenten Zellen depletierte Non-T-Fraktion) eines Patienten mit B-CLL. Maligne B-Zellen ($BA\text{-}1^+$, $OKIa^+$, T-Zell-Marker negativ) aus dem Lymphknoten eines anderen B-CLL-Patienten produzierten nach Mitogenstimulation kein IFN,aber geringe Mengen an IL-2.

Diese Daten zeigten, daß frisch isolierte und für wenige Tage kultivierte normale und maligne B-Zellen weder spontan noch nach Mitogeninduktion Interferon-γ bilden. Ähnliche Ergebnisse berichtete z.B. Ratliff (158), dem es nicht gelang, B-Zellen mit Hilfe von Protein A zur IFN-Produktion anzuregen.

Im Gegensatz dazu scheinen B-Zellen nach Stimulation mit Sendai-Virus in der Lage zu sein, α-Interferon zu bilden (216). Dies spricht für eine unabhängige Regulation der IFN-α- und -γ-Synthese in der B-Zelle. - Die geringe IL 2-Produktion durch maligne B-Zellen aus einem Lymphknoten deutete darauf hin, daß (entartete) B-Zellen die Kapazität zur Interleukin 2-Synthese besitzen.

Benjamin et al. (16) beschrieben kürzlich, daß B-lymphoide Zellinien von Burkitt-Lymphom-Patienten amerikanischer, nicht aber afrikanischer Abstammung nach Stimulation mit dem Tumorpromotor Teleocidin teilweise IL-2 bildeten. Teleocidin war auch in der Lage, in einer Prä-B-Burkitt-Linie die Produktion von IFN-γ zu induzieren und eine vorhandene IL 1-Produktion zu verstärken. Diese Ergebnisse zeigten, daß B-Zellen bzw. -Zellinien fähig sind, IL-1 zu sezernieren und daß sie zur Bildung von IL-2 und IFN-γ gebracht werden können. - Der Mechanismus der IL 2-Sekretion in B-Zellen ist unbekannt. IL-1 schien in den oben beschriebenen Versuchen die IL 2-Bildung nicht zu erhöhen, und IL-2 verstärkte nicht die IFN-γ-Produktion der B-Zellinie.

Die Lymphokine IL-2 und γ-IFN scheinen offensichtlich nicht exklusiv von T-Zellen produziert zu werden; Mitogene stellen jedoch keinen ausreichenden Stimulus für die Synthese von γ-IFN in B-Zellen dar.

4.4.2. T-Zellen

T-Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark gesunder Spender bildeten außer nach Stimulation mit IL-2 oder TPA plus PHA weniger IFN als die Gesamtpopulation der mononukleären Zellen, die IL 2-Produktion dagegen war in beiden Zellfraktionen vergleichbar.Nach Auftrennung der T-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper Leu9 in reife (Leu9-negative) und in frühe plus reife (Leu9-positive) T-Subpopulationen zeigten beide

Fraktionen ähnliche Interferonaktivitäten. Nach gleichzeitiger Trennung der T-Zellen mit Antikörpern gegen die reife T-Zellen charakterisierenden Antigene T4 und T8 zeigten die T4,8-negativen Populationen aus dem PB und KM höhere Interferontiter als die T4,8-positiven Fraktionen. - Diese Trennungen konnten nur mit einer Reinheit von 85% für die positiv selektionierten Populationen durchgeführt werden, da für doppelte Rosettierungen nicht genügend Zellmaterial verfügbar war. Dennoch deuten diese Versuche daraufhin, daß auch unreife, gesunde T-Zellen die Fähigkeit zur Interferonproduktion besitzen.
Interleukin-2 konnte mangels ausreichender Zellmengen zwar in der Leu9-positiven T-Zell-Fraktion aus dem KM gemessen werden, nicht aber in der aus dem PB und auch nicht in den mit OKT4/8 getrennten Populationen. Daher kann eine mögliche Fähigkeit früher T-Zellen zur Interleukin 2-Bildung nicht beurteilt werden.

Periphere T-Zellen von Patienten mit soliden Tumoren und mit B-CLL zeigten im Vergleich zu den T-Zellen gesunder Individuen reduzierte IFN -γ- und IL 2-Titer. Die B-CLL-T-Zellen konnten jedoch nur von 6% in der Gesamtfraktion auf 25% in der „T"-Fraktion angereichert werden. Um bei diesen Patienten eine Anreicherung der T-Zellen von über 85% zu erhalten, müßte man die Rosettierung mit Schafserythrozyten mindestens zweifach durchführen (56), was in diesem Fall aus technischen Gründen nicht möglich war.

Es ist anzunehmen, daß sich bei gründlicherer Zelltrennung die Interferonproduktion der T-CLL-Zellen, die stärker war als die der Gesamtfraktion, noch weiter normalisiert hätte. Gegen diese Vermutung sprechen Berichte anderer Arbeitsgruppen (29,89), die einen signifikanten Defekt in angereicherten T-CLL-Zellen fanden: diese antworteten nicht auf Mitogen oder Alloantigen und kooperierten bei der Immunglobulinsynthese nicht mit B-Zellen, sondern supprimierten vielmehr die Mitogen- oder Alloantigen-induzierte Proliferation normaler Lymphozyten.

Im Gegensatz dazu zeigten Wolos (215) und Lamberson (105), daß T-CLL-Zellen im Vergleich zu T-Zellen gesunder Personen auch eine normale Reaktivität auf Mitogene oder Alloantigene und eine fast normale Helferfunktion für die Proliferation und Differenzierung normaler B-Zellen aufweisen können. Foa (56) fand bei T-Zellen von CLL-Patienten nach Induktion mit PHA oder TPA plus PHA eine mit gesunden T-Zellen vergleichbare Produktion von IFN-γ und IL-2. Diese Befunde deuteten daraufhin, daß in B-CLL-Patienten trotz der verringerten T4/T8-Ratio und unabhängig von anderen funktionellen Defekten die Fähigkeit der verbliebenen T-Zellen zur IFN-γ- und IL 2-Bildung bewahrt ist. Foa konnte zeigen, daß die neoplastischen B-Zellen in vitro Interleukin 2 absorbieren und es auf diese Weise aus dem Zellkulturüberstand entfernen. Möglicherweise benützen die malignen B-Zellen IL-2 auch in vivo für ihre eigene Proliferation,was zu den dokumentierten Abnormalitäten der T-Lymphozyten in Chronischer Lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp führen könnte.

Die normalen γ-Interferontiter in T-Zellen von B-CLL-Patienten brachten Foa zu der Annahme, daß die immunologischen Defekte dieser Leukämiepatienten nicht verbunden sind mit einem Mangel an gebildetem γ-IFN, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Lymphokin, wie in anderen Situationen, auch in der B-CLL synergistisch zu Interleukin-2 wirkt.

Im Gegensatz zu T-Zellen von Patienten mit soliden Tumoren und B-CLL konnte in malignen unreifen T-Zellen von Patienten mit T-ALL mit Mitogen weder γ-IFN noch IL-2 und in malignen T-Zellen aus einem Thymom (beide unsepariert) zwar IL-2 in geringen Mengen, nicht aber Interferon induziert werden. Die fehlende Reaktivität der T-ALL-Patienten wurde bereits unter 4.3.2. diskutiert; das Unvermögen der aus dem Thymus isolierten Zellen, die mit den Antikörpern OKT3, 4, 6, 8, 10 und Leu9 positive Immunfluoreszenz zeigten, Interferon zu bilden, könnte trotz des Nachweises auch OKM1-positiver Zellen durch eine fehlende oder ungenügende Hilfe von „accessory cells" oder durch einen Defekt in den malignen Zellen selbst zustande gekommen sein. - Die (wenn auch in geringen Mengen) festgestellte Interleukin 2-Produktion durch die Thymomzellen war, bei fehlender IFN-γ-Bildung, ein weiterer Hinweis für eine unabhängige Regulation dieser Lymphokine in Tumorpatienten.

Daß sowohl OKT4-, als auch OKT8-positive T-Zellen unter geeigneten experimentellen Bedingungen γ-IFN produzieren können, ist bekannt (73 , 111 ,202). Das T4- und T8-Antigen erscheint relativ spät in der T-Zell-Ontogenie auf der Zelloberfläche und charakterisiert reife T-Helfer- bzw. T-Suppressorzellen. Schober et al. (170) beschrieben, daß auf γ-IFN-produzierenden, PHA stimulierten T-Zellen zusätzlich zum T3-, T4- oder T8-Antigen das Ia-Antigen zu finden ist. Da eine Ia-Expression auf frischen, in Kultur gebrachten T-Zellen erst ab Tag 8 bei ca. 10% und ab Tag 12 bei ca. 65% der Zellen nachzuweisen ist (12) und die Ia-positiven T-Zellen bei Schober nach der Stimulation maximal 4 Tage lang inkubiert worden waren, handelte es sich hier wahrscheinlich um T-Zellen, die bereits in vivo aktiviert worden waren.

Uns interessierte die Frage, ob neben reifen auch frühe T-Zellen in der Lage sind, Interferon zu bilden. Die mit getrennten Zellsubpopulationen durchgeführten Experimente deuteten daraufhin, daß auch T4,8-negative, also unreife, mit Schafserythrozyten rosettierende T-Zellen IFN bilden können. Wenn das zutrifft, müßte es auch Fälle unreifer T-Zell-Leukämien geben, die γ-IFN produzieren. Bei den selbst untersuchten Patienten mit T-ALL war dies nicht der Fall; von anderen Arbeitsgruppen dagegen wurde berichtet, daß eine humane T-lymphoblastoide Zellinie (136) und Zellen einer prolymphozytären Leukämie mit Suppressorphänotyp (220) nach Mitogenstimulation ohne Hilfe durch andere Zelltypen in großen Mengen γ-Interferon bildeten. Diese Befunde zeigten, daß frühe T-Zellen die Kapazität zur γ-IFN-Produktion besitzen; es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Fähigkeit zur γ-IFN-Sekretion mit der malignen Entartung dieser Leukämiezellen einherging, und daß die in den eigenen Experimenten gefundene γ-IFN-Bildung durch unreife, normale T-Zellen auf eine durch die Separationsschritte entstandene Aktivierung der Lymphozyten zurückzuführen ist.

Es besteht heute kein Zweifel mehr an der T-Zell- oder T-Zellinien-Abstammung von Interleukin-2. Es wird v.a. von T4-, aber auch von T8-positiven T-Zellen gebildet (12,127). Mit Hilfe von Limiting Dilution-Experimenten stellte Moretta (131) fest, daß in T4-positiven Populatio-

nen ca. 75% der Zellen Vorläufer für IL 2-Produzenten waren, während nur 15% der T8-positiven Zellen dieses funktionelle Potential besaßen. - Offenbar besteht also keine strikte Korrelation zwischen dem Phänotyp und der funktionellen Kapazität humaner periphere T-Zellen.

In den letzten Jahren nahmen Berichte über die Interferonproduktion durch Natürliche Killerzellen oder Large Granular Lymphocytes (LGL) zu, welche spontan gegen eine Reihe von Tumorzellinien Zytotoxizität ausüben. Timonen (187) vermutete als erster, daß LGL die Hauptproduzenten von IFN während des Abtötens von Tumorzellen sind. Djeu et al. (44) demonstrierten im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Abb (1), die keine Beteiligung von NK-Zellen an der α-IFN-Produktion fanden, daß LGL nach Virusstimulation α- und γ-Interferon bilden können. In ähnlicher Weise zeigte Ratliff (158), daß Protein A humane T- und Nullzellen zur γ-IFN-Synthese aktiviert, und Kasahara (92) fand nach Mitogengabe sogar eine stärkere Produktion von Lymphokinen (IFN, IL-2 und CSF) durch LGL als durch unseparierte mononukleäre Zellen oder durch T-Zellen. Dies wurde teilweise durch die eigenen Ergebnisse bestätigt: OKM-positive, mit Schaftserythrozyten rosettierte Zellen aus gesundem peripheren Blut bildeten nach Stimulation mit IL-2 oder TPA plus PHA mehr Interferon als T-Zellen; nach Induktion durch Mitogen allein produzierten beide Fraktionen ähnliche Titer an Interferon. - O'Malley (141) stellte bei der gleichen Zellfraktion ($SRBC^+$, $OKM1^+$) ebenfalls eine Sekretion von γ-IFN nach PHA-Stimulation fest.

Diese Daten lassen vermuten, daß NK-Zellen eine wichtige Quelle für Interferon in Antwort auf unterschiedliche Stimuli sind, wobei der Typ des von ihnen produzierten IFNs offenbar von der Natur des verwendeten Induktors abhängt (92). Die Herkunft der Large Granular Lymphocytes ist unsicher, da sie Charakteristika sowohl von T-Zellen als auch von myeloischen Zellen aufweisen: ein Teil der LGL exprimiert die T-Zell-assoziierten Antigene T8, T10 und T11, während ein anderer Teil OKM1 und Ia-Antigene trägt, die auch auf Non-T-Zellen zu finden sind (144). Der Befund, daß humane LGL nach 7-10 Tagen in Kultur mit Interleukin-2 OKT3-positiv werden (188), favorisiert die Ansicht, daß sie einer T-Linie angehören (oder aber, daß die Zellkultur das Auswachsen von T-Zellen begünstigte).

Erstaunlich war der Bericht von Kasahara, daß LGL auch Interleukin-2 produzieren können. Innerhalb der heterogenen Population der LGL scheinen die IL 2-Produzenten T3-negative, T11-positive Zellen zu sein, während ein LeuM1-/OKM1-positiver, myeloischer und/oder ein T8-positiver Subset offensichtlich die Regulation der IL 2-Bildung vornehmen (92).

4.4.3. Myeloische Zellen

Berichten unterschiedlicher Arbeitsgruppen zufolge produzieren Monozyten weder nach Kontakt mit Tumorzellen (188), noch nach Stimulation mit Mitogen oder bakteriellen Proteinen (7 ,158 ,170) γ-Interferon, dagegen scheinen sie nach Induktion mit Poly I:C oder Muramyldipeptid gute Produzenten von α-Interferon zu sein (178 ,216). Auch wurde die Bildung von Leukozyteninterferon durch myeloblastoide Zellinien nach Stimulation mit Sendai-Virus beschrieben (53).

Wir fanden bei isolierten Monozyten (Non-T-OKM1-positive Fraktion) aus dem Knochenmark gesunder Personen nach Mitogenstimulation keine Interferonproduktion, in der gleichen Fraktion aus dem peripheren Blut jedoch war IFN zu messen. Da die OKM1-positiven Zellen in dieser Fraktion nur zu 80% angereichert waren, ist es gut möglich und wahrscheinlich, daß verbliebene T-Zellen die Quelle des Interferons waren.

Unterschiedlich wird in der Literatur die Frage beantwortet, inwieweit Monozyten, allgemein „accessory cells", für die Bildung von γ-Interferon und Interleukin-2 notwendig sind. Wir fanden bei 10%igem Zusatz normaler Non-T OKM-positiver Zellen zu peripheren T- oder T OKM^{+}-Zellen eine bis zu vierfache Steigerung der IFN-Produktion. Der Zusatz myeloischer Zellen aus dem PB oder KM von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie zu gesunden PBL oder PBT erbrachte ebenfalls spontan und nach Mitogeninduktion eine Steigerung der IFN-Aktivität. Die Zugabe adhärenter Zellen zu der angereicherten T-Zell-Fraktion eines Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp jedoch konnte die oben beschriebene defekte IFN-Bildung nicht verändern.

Unsere Ergebnisse sind in Einvernehmen mit Berichten anderer Arbeitsgruppen (7 , 79,141), die eine Abhängigkeit γ -IFN-produzierender T-Zellen von Monozyten feststellten.

Epstein (50) zeigte eine signifikante Erhöhung der γ-IFN-Produktion durch Monozyten-depletierte Lymphozyten nach 20%iger Resubstitution von Monozyten. Ratliff (158) und Kasahara (92) bestätigten, daß Monozyten für eine maximale γ-IFN- und IL 2-Produktion durch T-Zellen notwendig sind, stellten jedoch auch fest, daß Monozyten die γ-Interferonbildung durch Nullzellen supprimieren und die Interleukin 2-Bildung durch Large Granular Lymphocytes nicht verändern.

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß Monozyten (OKM-positive Non-T-Zellen) durch Mitogene nicht zur Interferonproduktion induziert werden, daß sie aber, zugesetzt zu T- oder T OKM-positiven Zellfraktionen zu einer Verstärkung der Interferonaktivität führen.

5. AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interferonproduktion bei Patienten mit malignen Erkrankungen vor allem in der Gesamtfraktion mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark untersucht. Es wurde gezeigt, daß die Interferonbildung bei Patienten mit unterschiedlichen Tumoren häufig vermindert ist.
Zur weiteren Aufklärung der Rolle von Interferon bei Tumoren sollten, ähnlich wie es für gesunde Personen hier beschrieben wurde, exakte Zelltrennungen durchgeführt werden. Damit könnten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob T-Zellen von Tumorpatienten in der Kapazität zur Interferonbildung defekt sind, ob für die IFN-Produktion wichtige Faktoren, wie z.B. Interleukin-2, nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, oder ob die Interferonsekretion etwa aufgrund verstärkter Suppressormechanismen vermindert ist.

Nachdem im Tiermodell die inhibierende Wirkung von Interferon auf Tumoren nachgewiesen war, wurde mit der Tumortherapie mit Interferon beim Menschen begonnen (67,125,126). Zur Zeit werden weltweit klinische Studien der Phasen I bis III sowohl mit IFN-α aus lymphoblastoiden Zellinien, IFN-β aus Fibroblastenkulturen als auch mit rekombinantem α-, β- und γ-Interferon durchgeführt (126). Erfolg wurde erreicht bei der Interferon-Behandlung akuter Infektionen mit Herpes-, Adeno-, Rhino- oder Papillomaviren und bei der chronischen Hepatitis B. Bei den malignen Erkrankungen konnte bei kontinuierlicher Interferontherapie ein Tumorrückgang bei Lymphomen, Myelomen, Melanomen, der Haarzell-Leukämie und dem Kaposi-Sarkom erzielt werden (126).

Ein größerer Einsatz von Interferon in der Therapie hängt von der ausstehenden Klärung des Wirkungsmechanismus von Interferon in malignen Erkrankungen ab. Noch ist unbekannt, wie Interferon z.B. in Leukämien Remissionen induziert, ob diese Wirkung etwa durch eine Verstärkung der Immunabwehr oder durch direkte antiproliferative Effekte zustande kommt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Testsystem etabliert, mit dessen Hilfe die Interferonproduktion und die Lymphoproliferation in kleinen Blutproben von Patienten bestimmt werden können. Dieser Vollbluttest wurde verglichen mit dem herkömmlichen Lymphozytentransformationstest,bei dem isolierte periphere Blutlymphozyten eingesetzt werden. Mischungen aus heparinisiertem Vollblut und Kulturmedium oder eine entsprechende Anzahl peripherer Blutlymphozyten wurden zusammen mit T-Zell-Mitogenen kultiviert. Die Interferonproduktion im Vollblut zeigte sich bei Einsatz aller verwendeten Mitogene erhöht gegenüber dem Lymphozytentransformationstest, die Zellproliferation war im Vollbluttest nach Phytohämagglutinin- und Concanavalin A-Induktion signifikant erhöht, in Antwort auf Pokeweed Mitogen dagegen in beiden Testsystemen vergleichbar. - Da bei dem Vollblutassay die Zellpopulationen in ihrer natürlichen Verteilung erhalten bleiben, könnte dieser Test die in vivo-Situation besser wiederspiegeln als ein Assay, bei dem isolierte Lymphozyten verwendet werden. Untersuchungen zeigten, daß der Vollbluttest gut geeignet ist, um bei Patienten mit dén unterschiedlichsten Erkrankungen den Immunstatus bezüglich der mitogeninduzierten Interferonproduktion und Proliferation zu bestimmen.

Bei der Untersuchung über den Einfluß verschiedener zellulärer Oberflächenantigendeterminanten auf die γ-Interferonproduktion wurde als Testsystem zuerst die Gemischte Lymphozytenkultur eingesetzt. Sowohl in autologen als auch in allogenen Kulturen konnte eine gute Zellproliferation induziert werden, höhere Interferontiter resultierten jedoch nur nach allogener Stimulation. Zusätzlich bestanden zwischen den einzelnen Versuchen große Schwankungen in den Interferon-Aktivitäten, sodaß für die Erfassung von Differenzen in der Interferonproduktion einzelner Individuen von diesem Testsystem abgegangen werden mußte.

Unterschiede in der Interferon-, Interleukin 2-Produktion und Proliferation durch Lymphozyten aus dem peripheren Blut und Knochenmark von gesunden Personen und Patienten mit malignen Erkrankungen wurden im Folgenden nach Mitogenstimulation untersucht. Es stellte sich heraus, daß Zellen aus dem Knochenmark, welches neben reifen auch viele unreife Zellen enthält, wie periphere Blutlymphozyten in der Lage sind, Lymphokine zu produzieren und zu proliferieren. Periphere, „normale" Zellen von Patienten mit soliden Tumoren und malignen Paraproteinämien zeigten im Vergleich zu Kontrollspendern eine veränderte Interferon- und Interleukin 2-Produktion. Auffällig war, daß die Interferon- und Interleukin 2-Bildung weder miteinander noch jede für sich mit der Proliferation korrelierte. Zellpopulationen von Patienten mit Lymphatischen Leukämien zeigten, unabhängig vom Phänotyp, geringe Lymphokintiter; bei Patienten mit Myeloischen Leukämien wurde dagegen auch spontan Interferon gebildet.

Ergebnisse von Experimenten mit getrennten Zell-Subpopulationen aus peripherem Blut und Knochenmark deuteten darauf hin, daß reife, unreife als auch OKM-positive T-Zellen gesunder Personen nach Mitogenstimulation γ-Interferon produzieren können.
„Gesunde" T-Zellen von Tumorpatienten zeigten im Vergleich zu normalen T-Fraktionen reduzierte Lymphokintiter, während maligne T-Zellen gar kein Interferon, aber geringe Mengen an Interleukin-2 bildeten.
Normale B-Zellen von gesunden Individuen und Tumorpatienten produzierten, wie auch maligne B-Zellen und Monozyten, nach Mitogenstimulation kein Interferon; dagegen wurde die von T-Zellen stammende antivirale Aktivität durch Zusatz myeloischer Zellen verstärkt.

7. LITERATUR

1. Abb, J., Abb., H., Deinhardt, F. (1984)
Relationship between natural killer (NK) cells and interferon (IFN) alpha-producing cells in human peripheral blood. Studies with a monoclonal antibody with specificity for human natural killer cells
Immunobiol. 167,359

2. Adolf, G.R., Haas, O.A., Fischer, P., Swetly, P. (1982)
Spontaneous production of alpha- and beta-interferon in human lymphoblastoid and lymphoma cell lines
Arch.Virol. 72,169

3. Aguet, M., Vignaux, F., Fridman, W.H., Gresser, I. (1981)
Enhancement of Fc receptor expression in interferon-treated mice
Eur.J.Immunol. 11,926

4. Aguet, M., Groebke, M., Dreiding, P. (1983)
Down-regulation of interferon receptors
in: The biology of the interferon system 1983, Hrsg. DeMaeyer, E., Schellekens, H., Elsevier Science Publisher B.V., 161

5. Anderson, D.W., Hayward, A., Jones, C. (1981)
An acute lymphoblastic leukemia with produces human T cell growth factor
Immunol.Commun. 10,697

6. Andreotti, P.E., Cresswell, P. (1981)
HLA control of interferon production in the human mixed lymphocyte çulture
Human Immunol. 3,109

7. Arbeit, R.D., Leary, L.P., Levin, M.J. (1982)
Gamma-interferon production of human peripheral blood lymphocytes, monocytes, and cultured macrophages
Infect.Immun. 35,383

8. Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L. (1983)
Interferons as macrophage-activating factors. II. Enhanced secretion of interleukin 1 by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes
Eur.J.Immunol. 13,437

9. Argov, S., Cantell, K., Klein, E., Klein, G. (1983)
Immune interferon (IFN-γ) production in autologous mixed cultures
Cell.Immunol. 76,196

10. Balkwill, F.R., Oliver, R.T.D. (1977)
Growth inhibitory effects of interferon on normal and malignant human haemopoietic cells
Int.J.Cancer 20,500

11. Balkwill, F.R., Griffin, D.B., Band, H.A., Beverly, P.C. (1983)
Immune human lymphocytes produce an acid-labile α-interferon
J.Exp.Med. 157,1059

12. Baum, W. (1984)
Untersuchung über die Expression von Oberflächenantigenen auf Helfer- und Suppressor-zytotoxischen T-Lymphozyten in Interleukin-2 abhängigen Langzeitkulturen im humanen System
Diplomarbeit, Erlangen

13. Beck, J., Engler, H., Brunner, H., Kirchner, H. (1980)
Interferon production in cocultures between mouse spleen cells and tumor cells. Possible role of mycoplasmas in interferon induction
J.Immunol.Meth. 38,63

14. Becker, S. (1985)
Interferon-γ accelerates immune proliferation via its effect on monocyte HLA-DR expression
Cell.Immunol. 91,301

15. Bell, D.M., Roberts Jr., N.J., Hall, C.B. (1983)
Different antiviral spectra of human macrophage interferon activities
Nature 305,319

16. Benjamin, D., Hartmann, D.P., Bazar, L.S., Jacobson, R.J.(1985)
Induction of interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN-gamma) with teleocidin in Burkitts lymphoma cells
Proc. 17th Ann.Mtg.Am.Assoc.Cancer Res. (AACR) 26,301, Houston, Texas

17. Berger, R., Knapp, W., Kirchner, H. (1984)
Interferon induction in human mixed leucocyte tumor cell reactions: evidence for restriction to a certain lineage expressing glycophorin A
Int.J.Cancer 34, 39

18. Besancon, F., Bourgeade, M.F., Testa, U. (1985)
Modulation of transferrin receptors expression by interferon-alpha
The interferon system, prog. and abstr.,92, Inst. Superiore di sanita, Rom, Italien

19. Beverly, P., Knight, D. (1979)
Killing comes naturally
Nature 278,119

20. Bhan, A.K., Nadler, L.M., Stashenko, P., McCluskey, R.T., Schlossman , S.F. (1981)
Stages of B cell differentiation in human lymphoid tissue
J.Exp.Med. 154,737

21. Bhayani, H., Williams, G., Johnstone, A. (1984)
Dissociation of DNA synthesis from differentiation during IFN γ production in mitogen stimulated human lymphocytes
Immunobiol. 167,238

22. Biondi, A., Roach, J.A., Schlossman, S.F., Todd, R.F.III (1984)
Phenotypic characterization of human T lymphocyte populations producing macrophage-activating factor (MAF) lymphokines
J.Immunol. 133,281

23. Birke, C., Peter, H.H., Langenberg, U., Müller-Hermes, W.J.P., Peters, J.H., Heiman, J., Leibold, W., Dallügge, H., Krapf, E., Kirchner, H. (1981)
Mycoplasma contamination in human tumor cell lines: effect on interferon induction and susceptibility to natural killing
J.Immunol, 127,94

24. Bøyum, A. (1976)
Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages
Scand.J.Immunol. 5,9

25. Branca, A.A., Baglioni, C. (1981)
Evidence that types I and II interferons have different receptors
Nature 294,768

26. Brodeur, B.R., Merigan, T.C. (1974)
Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice
J.Immunol. 113,1319

27. Brouty-Boye, D., Gresser, I. (1981)
Reversibility of the transformed and neoplastic phenotype I. Progressive reversion of the phenotype of x-ray transformed C3H/10T 1/2 cells under prolonged treatment with interferon
Int.J.Cancer 28,165

28. Broxmeyer, H.L., Lu, L., Platzer, E., Fleit, C., Juliano, L., Rubin, B.Y. (1983)
Comparative analysis of the influences of human gamma, alpha and beta interferons on human multipotential (CFU-GEMM), erythroid (BFU_E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells
J.Immunol. 131,1300

29. Callery, R.T., Strelkauskas, A.J., Yanovich, S., Marks, S., Rosenthal, D., Schlossman, S. (1980)
Functional abnormalities associated with T lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia
Clin.Immunol.Immunopathol. 17,451

30. Ceuppens, J.L., Gualde, N., Goodwin, J.S. (1982)
Phenotypic heterogeneity of the OKM1-positive lymphocyte population: reactivity of OKM1 monoclonal antibody with a subset of the suppressor-cytotoxic T cell population
Cell.Immunol. 69,150

31. Chang, T.W., Testa, D., Kung, P.C., Perry, L., Dreskin, H.J., Goldstein, G. (1982)
Cellular origin and interactions involved in γ-interferon production induced by OKT3 monoclonal antibody
J.Immunol. 128,585

32. Clauß, G., Ebner, H. (1977)
Grundlagen der Statistik
Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/Main

33. Cole, B.C., Daynes, R.A., Ward, J.R. (1982)
Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from mycoplasma arthritidis. III. Ir gene control of lymphocyte transformation correlates with binding of the mitogen to specific Ia-bearing cells
J.Immunol. 129,1352

34. Cole, B.C., Thorpe, R.N. (1983)
Induction of human γ interferons by a mitogen derived from mycoplasma arthritidis and by phytohemagglutinin: differential inhibition with monoclonal anti-HLA-DR antibodies
J.Immunol. 131,2392

35. Currie, G. (1978)
Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase
Nature 273,758

36. Dayton, E.T., Matsumoto-Kobayashi, M., Perussia, B., Trinchieri, G. (1985)
Role of immune interferon in the monocytic differentiation of human promyelocytic cell lines induced by leukocyte conditioned medium
Blood 66,583

37. DeBoen, K.P., Braun, D.P., Harris, J.E. (1982)
Natural cytotoxicity and antibody-dependent cytotoxicity in solid tumor cancer patients: regulation by adherent cells
Clin.Immunol.Immunopathol. 23,133

38. DeMaeyer, E., DeMaeyer-Guignard, J. (1968)
Influence of animal genotype and age on the amount of circulating interferon induced by Newcastle disease virus
J.Gen.Virol. 2,445

39. Depper, J.M., Leonard, W.J., Drogula, C., Krönke, M., Waldmann, T.A., Greene, W.C. (1985)
Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene
Proc.Natl.Acad.Sci USA 82,4230

40. Derynck, R., Content, J., Declercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos R., Fiers, W. (1980)
Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene
Nature 285,542

41. DeStefano, J., Friedman, R.M., Friedman, A.E., Goedert, J.J., Henriksen, D., Preble, O.T., Sonnabend, J.A., Vilcek, J. (1982)
Acid-labile human leukocyte interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma and lymphadenopathy
J.Inf.Dis. 146,451

42. Dexter, T.M., Boettiger, D., Spooncer, E. (1985)
Self-renewal of haemopoietic stem cells: the roles of the environment, of growth factors and of the src oncogene
Haematol. and blood transfusion 29,363

43. Dimitriu-Bona, A., Winchester, R.J., Szer, I., Reilly, M., Najfeld, V., Cutter, J. (1983)
Expression of early or mature monocyte-related antigens on certain acute myeloid leukemias (AML) before and after culture
Clin.Res. 31,512A

44. Djeu, J.Y., Timonen, T., Herberman, R.B. (1982)
Production of interferon by human natural killer cells in response to mitogens, viruses and bacteria
in: NK cells and other natural effector cells,669, Hrsg. Herberman, R.B., Academic Press, New York

45. Doldi, K., Manger, B., Koch, B., Riemann, J., Hermanek, P., Kalden, J.R. (1984)
Spontaneous suppressor cell activity in the peripheral blood of patients with malignant and chronic inflammatory bowel diseases
Clin.Exp.Immunol. 55,655

46. Doldi, K., Leroux, M., Augustin, R., Kirchner, H., Kalden, J.R. (1985)
Proliferation and interferon production in whole blood samples and isolated lymphocyte preparations
J.Interferon Res. 5,55

47. Dore-Duffy, P., Perry, W., Kuo, H.H. (1983)
Interferon-mediated inhibition of prostaglandin synthesis in human mononuclear leukocytes
Cell.Immunol. 79,232

48. Egeland, T., Lea, T. (1982)
A rapid rosette technique for quantitation and separation of mononuclear cell subsets using monoclonal antibodies
J.Immunol.Meth. 55,213

49. Engler, H. (1982)
Dissertation, Heidelberg

50. Epstein, L.B., Cline, M.J., Merigan, T.C. (1971)
The interaction of human macrophages and lymphocytes in the phytohemagglutinin-stimulated production of interferon
J.Clin.Invest. 50,774

51. Everson, T.C., Cole, W.H. (1966)
Spontaneous regression of cancer, W.B. Saunders Company

52. Falke, D., Brauer, D. (1980)
Virusinterferenz und Interferon
Dtsch.Apoth.Zeitg. 43,2037

53. Familletti, P.C., McCandliss, R., Pestka, S. (1981)
Production of high levels of human leukocyte interferon from a continuous human myeloblast cell culture
Antimicrob. Agents Chemother. 20,5

54. Farrar, W.L., Johnson, H.M., Farrar, J.J. (1981)
Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2
J.Immunol. 126,1120

55. Farrar, W.L., Anderson, W.B. (1985)
Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane
Nature 315,233

56. Foa, R., Giovarelli, M., Jemma, C., Fierro, M.T., Lusso, P., Ferrando, M.L., Lauria, F., Forni, G. (1985)
Interleukin 2 (IL 2) and interferon-γ production by T lymphocytes from patients with B-chronic, lymphocytic leukemia: evidence that normally released IL 2 is absorbed by the neoplastic B cell population
Blood 66,614

57. Foon, K.A., Schroff, R.W., Gale, R.P. (1982)
Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances
Blood 60,1

58. Frank, M.B., Watson, J., Mochizuki, D., Gillis, S. (1981)
Biochemical and biologic characterization of lymphocyte regulatory molecules. VIII. Purification of interleukin-2 from a human T cell leukemia
J.Immunol. 127,2361

59. Friedman, S.M., Thompson, G., Halper, J.P., Knowles, D.M.(1982)
OT-CLL: a human T cell chronic lymphocytic leukemia that produces IL 2 in high titer
J.Immunol. 128,935

60. Fujita, T., Takeoka, C., Matsui, H., Taniguchi, T. (1983)
Structure of the human interleukin 2 gene
Proc.Natl.Acad.Sci USA 80, 7437

61. Gazitt, Y., Ben-Bassat, H., Wallach, D., Revel, M., Schattner, A., (1984)
Interferon-induced cytotoxicity and (2'-5') oligo (A) synthetase activity in T cells. Differences in responsiveness among T cells from various individuals and among lymphoblastoid T cell lines
Clin.Immunol.Immunopathol. 30,71

62. Gillis, S., Kozak, R., Durante, M., Weksler, M.E. (1981)
Immunological studies of aging, decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans
J.Clin.Invest. 67,937

63. Gramatzki, M., Strong, D.M., Grove, S.B., Bonnard, G.D. (1982)
Cryopreserved human cultured T cells as responder cells for the quantitative measurement of interleukin-2
J.Immunol.Meth. 53,209

64. Gramatzki, M., Dolan, M.F., Fauci, A.S., Maples, J.A., Bonnard, G.D., Strong, D.M. (1982)
Immunologic characterization of a helper T-cell lymphoma
Blood 59,702

65. Gramatzki, M., Bonnard, G.D., Herberman, R.B., Strong, D.M. (1985)
Characterization of cell lines enhancing IL-2 production by human phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes
Cell.Immunol. 90,142

66. Gray, P.W., Goeddel, D.V. (1982)
Structure of the human interferon gene
Nature 298,859

67. Gresser, I. (1978)
Antitumor effects of interferon
Biochim.Biophys.Acta 516,231

68. Hanyan, S.N.S., Kearney, J.F., Cooper, M.D. (1982)
A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells
Clin.Immunol.Immunopathol. 23,172

69. Haynes, B.F., Mann, D.L., Hemler, M.E., Schroer, J.A., Shelhamer, J.H., Eisenbarth, G.S., Strominger, J.L., Thomas, C.A., Mostowski, H.S., Fauci, A.S. (1980)
Characterization of a monoclonal antibody that defines an immunoregulatory T cell subset for immunoglobulin synthesis in humans
Proc.Natl.Acad.Sci USA 77,2914

70. Herberman, R.B., Ortaldo, J.R., Bonnard, G.D. (1979)
Augmentation of interferon of human antibody dependant cell-mediated cytotoxicity
Nature 277,221

71. Herberman, R.B. (1981)
Review article: Significance of natural killer (NK) cells in cancer research
Human Lymphocyte Differentiation 1,63

72. Hooks, J.J., Moutsopoulos, H.M., Geis, S.A., Stahl, N.L., Decker, J.L., Notkins, A.L. (1979)
Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease
N.Engl.J.Med. 301,5

73. Hooks, J.J., Haynes, B.F., Detrick-Hooks, B., Diehl, L.F., Gerrard, T.L., Fauci, A.S. (1982)
Gamma (immune) interferon production by leukocytes from a patient with a T_G cell proliferative disease
Blood 59, 198

74. Huber, C., Merkenschlager, M., Gattringer, C., Royston, I., Fink, U., Braunsteiner, H. (1982)
Human autologous mixed lymphocyte reactivity is primarily specific for xenoprotein determinants adsorbed to antigen-presenting cells during rosette formation with sheep erythrocytes
J.Exp.Med. 155,1222

75. Imanishi, J., Hoshino, S., Matsuoka, H., Kishida, T., Minowada, J. (1982)
Antigenic types of various human lymphoblastoid cell interferons
Biken J. 25,97

76. Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957)
Virus interference. I. The interferon
Proc.R.Soc.Lond.(Biol.) 147,258

77. Isaacs, A., Lindenmann, J., Valentine, R.C. (1957)
Virus interference. II. Some properties of interferon
Proc.R.Soc.Lond.(Biol.) 147,268

78. Isacov, N., Bleackley, R.C., Shaw, J., Altman, A. (1985)
The tumor promotor teleocidin induces IL2 receptor expression and IL2-independent proliferation of human peripheral blood T cells
J.Immunol. 135,2343

79. Ishida, N., Asano, M., Moda, T., Yoshie, O., Manjo, M., Ebina, E. (1985)
Mechanisms of interferon-gamma production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells by OK-432, a streptococcal preparation
Abstr. 14th Int.Cong.Chemother. (ICC),233, Kyoto, Japan

80. Itoh, K., Tsuchikawa, K., Awataguchi, T., Shiiba, K., Kumagai, K. (1983)
A case of chronic lymphocytic leukemia with properties characteristic of natural killer cells
Blood 61, 940

81. Jemma, C., Meregalli, M., Bernengo, M.G. (1985)
Interferon gamma and interleukin-2 production by sezary cells
The interferon system-prog. and abstr., 79, Inst. superiore di sanita, Rom, Italien

82. Joachim, H.L. (1976)
The stromal reaction of tumors: an expression of immune surveillance
J.Natl.Cancer Inst. 57,465

83. Johnson, H.M., Torres, B.A. (1982)
Phorbol ester replacement of helper cell and interleukin 2 requirements in gamma interferon production
Infect.Immun. 36,911

84. Johnson, H.M., Farrar, W.L. (1983)
The role of gamma interferon-like lymphokine in the activation of T cells for expression of interleukin 2 receptors
Cell.Immunol. 75,154

85. Johnson, H.M., Vasallo, T., Torres, B. (1985)
Interleukin 2-mediated events in γ-interferon production are calcium dependent at more than one site
J.Immunol. 134,967

86. Julius, M.H., Simpson, E., Herzenberg, L.A. (1973)
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes
Eur.J.Immunol. 3,645

87. Junge, U., Hoekstra, J., Wolfe, L., Deinhardt, F. (1970)
Microtechnique for quantitative evaluation of in vitro lymphocyte transformation
Clin.Exp.Immunol. 7,431

88. Kabelitz, D., Kirchner, H., Amerding, D., Wagner, H. (1985)
Recombinant interleukin 2 rapidly augments human natural killer cell activity
Cell.Immunol. 93,38

89. Kai, S., Hamano, T., Fujita, S., Nakamuta, K., Hara, H., Nagai, K. (1980)
Suppression of mitogen- and alloantigen-induced proliferation by chronic lymphocytic leukemia cells of T-cell origin
Clin.Immunol.Immunopathol. 17,427

90. Kaneoka, H., Perez-Rojas, G., Sasasuki, T., Benike, C.J., Engleman, E.G. (1983)
Human T lymphocyte proliferation induced by a pan-T monoclonal antibody (anti-Leu-4): Heterogeneity of response is a function of monocytes
J.Immunol. 131,158

91. Kaneoko, Y., Miyakoshi, H., Aoyagi, Y., Aoki, T. (1985)
Immune status of leukemia patients
Haematol. and blood transfusion 29,200

92. Kasahara, T., Djeu, J.Y., Dougherty, S.F., Oppenheim, J.J. (1983)
Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor
J.Immunol. 131,2379

93. Kasahara, T., Hooks, J., Dougherty, S.F., Oppenheim, J.J. (1983)
Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-γ) production by human T cells and T cell subsets
J.Immunol. 130,1784

94. Kirchner, H., Kleinicke, C., Digel, W. (1982)
A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes
J.Immunol.Meth. 48,213

95. Kirchner, H. (1982)
Interferons as antitumor agents
J.Cancer Res.Clin.Oncol. 103,1

96. Kirchner, H. (1982)
Logistics of tumor immunology
Klin.Wochenschr. 60,37

97. Kirchner, H. (1984)
Interferons, a group of multiple lymphokines
Springer Semin.Immunopathol., Ms. Beitrag 164,1

98. Kirchner, H., Marcucci, F. (1984)
Interferon production by leukocytes
in: Interferon 2: interferons and the immune system, Hrsg. Vilcek, J., DeMaeyer, E., Kap. 2,7

99. Kirchner, H. (1984)
Interferon-gamma
Progr.Clin.Biochem.Med. 1,169

100. Kirchner, H. (1984)
Immunologic surveillance and human papillomaviruses
Immunol.Today 5,272

101. Klein, G. (1981)
The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis
Nature 294,313

102. Koch, B., Regnat, W., Solbach, W., Lanz, R., Hermanek, P., Kalden, J.R. (1984)
Interleukin-2 production in peripheral blood mononuclear cells of patients with gastrointestinal tumors
J.Clin.Lab.Immunol. 13,171

103. Krajewski, A.S., Dewar, A.E., Seidelin, P.H., Murray, R. (1983)
Colony formation and interleukin 2 production by leukaemic human T cells
Clin.Exp.Immunol. 54,103

104. Kyewski, B.A. (1985)
Thymic dendritic cells present blood-borne antigens to medullary thymocytes in vivo: a possible role in the generation of the T-cell repertoire
Haematol. and blood transfusion 29, 486

105. Lamberson, H.V., Davey, F.R., Schreck, C.M., Zamkoff, K., Kurec, A.S. (1984)
Lymphocyte response to pokeweed mitogen in chronic lymphocytic leukemia
Cancer 53,2481

106. Landolfo, S., Marcucci, F., Schirrmacher, V., Kirchner, H. (1981)
Characteristics of alloantigens and cellular mechanism responsible for γ-IFN production in primary murine MLC
J.Interferon Res. 1,339

107. Landolfo, S., Arnold, B., Suzan, M. (1982)
Immune (γ) interferon production by murine T cell lymphomas
J.Immunol. 128,2807

108. Lanier, L.L., Le, A.M., Phillips, J.H., Warner, N.L., Babcock, G.F., (1983)
Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NKP-15) antigens
J.Immunol. 131,1789

109. Lazar, A., Jackson, R., Grossmayer, B., Mizrahi, A., Freeman, A.I., O'Malley, J.A. (1981)
Interferon production and lymphocyte transformation in lymphocytes of leukemic patients
J.Interferon Res. 1,443

110. Lazar, A., Reuveny, S., Traub, A., Minai, M., Grosfeld, H., Feinstein, S., Gez, M., Mizrahi, A. (1981)
Factors affecting the large scale production of human lymphoblastoid interferon
Dev.Biol.Stand. 50,167

111. Le, J., Prensky, W., Henriksen, D., Vilcek, J. (1982)
Synthesis of alpha and gamma interferons by a human cutaneous lymphoma with helper T-cell phenotype
Cell.Immunol. 72,157

112. LeBien, T.W., Brashem, C.J., Abramson, C.S., Frenzel, E.M., Bollum, F.J., Kershey, J.H. (1981)
Studies of human lymphopoiesis with monoclonal antibodies BA-1 and BA-2
in: Leukemia Markers, 81. Hrsg. Knapp, W., Academic Press Inc.

113. Lengyel, P. (1982)
Biochemistry of interferons and their actions
Ann.Rev.Biochem. 51,251

114. Levin, S., Hahn, T. (1985)
Interferon deficiency syndrome
Clin.Exp.Immunol. 60,267

115. Lindahl-Magnusson, P., Leary, P., Gresser, I. (1972)
Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohemagglutinin or by allogeneic cells
Natur 237,120

116. Lindahl, P., Gresser, I., Leary, P., Tovey, M. (1976)
Interferon treatment of mice: enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells
Proc.Natl.Acad.Sci USA 78,1284

117. Link, M., Warnke, R., Finlay, J., Amylon, M., Miller, R., Dilley, J., Levy, R. (1983)
A single monoclonal antibody identifies T cell lineage of childhood lymphoid malignancies
Blood 62,722

118. Manger, B., Kalden, J.R., Zawatzky, R., Kichner, H. (1981)
Interferon production in the mixed lymphocyte culture
Transplantation 32,149

119. Marcucci, F., Kirchner, H., Resch, K. (1980)
Mitogen-induced interferon production by normal and steroid-resistant mouse thymocytes
J. Interferon Res. 1,87

120. Marcucci, F., Waller, M., Kirchner, H., Krammer, P. (1981)
Production of immune interferon (IFN-γ) by murine T cell clones from long-term cultures
Nature 291,79

121. Martinez-Maza, O., Andersson, U., Andersson, J., Britton, S., DeLey, M. (1984)
Spontaneous production of interferon-γ in adult and newborn humans
J.Immunol. 132,251

122. Matsuyama, M., Sairenji, T., Yonemura, K., Hinuma, Y. (1982)
Interferon production potentials of various human lymphoblastoid cell lines
Microbiol.Immunol. 26,1149

123. Matsuyama, M., Sugamura, K., Kawade, Y., Hinuma, Y. (1982)
Production of immune interferon by human cytotoxic T cell clones
J.Immunol. 129,450

124. McCulloch, E.A. (1983)
Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982)
Blood 62,1

125. Merigan, T.C. (1981)
Present appraisal and future hopes for the clinical utilization of human interferons
Interferon 3,135

126. Merigan T.C. (1985)
Clinical effects of interferons
in: Cellular and molecular biology of lymphokines, 699, Hrsg. Sorg, C., Schimpl, A., Academic Press

127. Meuer, S.C., Hussey, R.E., Penta, A.C., Fitzgerald, K.A., Stadler, B.M., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L. (1982)
Cellular origin of interleukin 2 (IL 2) in man: evidence for stimulus-restricted IL 2 production by $T4^+$ and $T8^+$ T lymphocytes
J.Immunol. 129,1076

128. Meuer, S.C., Acuto, O., Hussey, R.E. Hodgdon, J.C., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L. (1983)
Evidence for the T3-associated 90 KD heterodimer as the T cell antigen receptor
Nature 303,808

129. Miyawaki, T., Seki, H., Taga, K., Sato, H., Taniguchi, N. (1985)
Dissociated production of interleukin-2 and immune (gamma) interferon by phytohemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants
Clin.Exp.Immunol. 59,505

130. Mjörner,H., Landstroem, L.E., Larner, E., Larsson, I., Lundgren, E., Strannegard, Ö. (1978)
Regulation of mitogen-induced lymphocyte DNA synthesis by human interferon of different origins
Cell.Immunol. 35,15

131. Moretta, A. (1985)
Frequency and surface phenotype of human T lymphocytes producing interleukin 2. Analysis by limiting dilution and cell cloning
Eur.J.Immunol. 15,148

132. Morris, A.G. (1986)
Effects of interleukin on IFN-γ production (Vortrag)
IUIS/WHO Lymphokine Standardization Subcommittee, Erlangen

133. Müller, D.S., Manger, B. Zawatzky, R., Kirchner, H., Kalden, J.R. (1984)
Mitogen-induced γ interferon production in peripheral blood lymphocytes from patients with colorectal tumors
Immunobiol. 166,494

134. Nadler, L.M., Stashenko, P., Hardy, P., Van Agthoven, A., Terhorst, C., Schlossman, S.F. (1981)
Characterization of human B cell-specific antigen (B2) distinct from B1
J.Immunol. 126,1941

135. Nadler, L.M., Anderson, K.C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J.F., Schlossman, S.F. (1983)
B4, a human B lymphocyte associated antigen expressed on normal, mitogen activated and malignant B lymphocytes
J.Immunol. 131,244

136. Nathan, I., Groopman, J.E., Quan, S.G., Bersch, N., Goide, D.W. (1981)
Human (γ) interferon produced by a human T-lymphoblast cell line
Nature 292,842

137. Neefe, J.R., Curl, G.R., Woody, J.N. (1981)
Absolute requirement for adherent cells in the production of human interleukin 2 (IL 2)
Cell.Immunol. 63,71

138. Northoff, H., Hooks, J.J., Jordan, G., Oppenheim, J.J. (1980)
Direct correlation between the production of interleukin 2 (IL-2) and immune interferon (IF) by human mononuclear cells (MNL)
Behring Inst.Mitt. 67,90

139. Nowell, P.C., Emanuel, B.S., Finan, J.B., Erikson, J., Croce, C.M. (1985)
Chromosome alterations in oncogenesis
Haematol. and blood transfusion 29,253

140. Oettgen, H.F. (1977)
Immunotherapy in cancer
N.Engl.J.Med. 297,484

141. O'Malley, J.A., Nussbaum-Blumenson, A., Sheedy, D., Grossmayer, B.J., Ozer, H. (1982)
Identification of the T cell subset that produces human interferon
J.Immunol. 128,2522

142. Orlova, T.G., Berulava, I.I., Gavrilova, I.E. (1982)
Production of virus-induced interferon by bone marrow cells from children with acute leukemia
Vopr. Virusol. 27,15

143. Orlova, T.G., Pavlushina, S.V., Gavrilova, I.E. (1983)
Immune interferon in hemoblastoses in children
Antiviral Res., special abstr. issue 2, A1

144. Ortaldo, J.R., Sharrow, S.O., Timonen, T., Herberman, R.B. (1981)
Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flowcytometry with monoclonal antibodies
J.Immunol. 127,2401

145. Ownby, D.R., McCullough, J. (1983)
An improved technique for separating rosetted from non-rosetted lymphocytes
J.Immunol.Meth. 56,281

146. Ozer, H., Han, T., Henderson, E.S., Nussbaum, A., Sheedy, D. (1981)
Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma
J.Clin.Invest. 67,779

147. Panem, S., Vilcek, J. (1983)
Antibodies to interferon in man
in: The biology of the interferon system, 369. Hrsg. De Maeyer, E., Schellekens, H., Elsevier Science Publishers B.V.

148. Papermaster, V., Torres, B.A., Johnson, H.M. (1983)
Evidence for suppressor T-cell regulation of human gamma interferon production
Cell.Immunol. 79,279

149. Pauly, L.J., Sokal, J.E., Han, T. (1973)
Whole-blood culture technique for functional studies of lymphocyte reactivity to mitogens, antigens, and homologous lymphocytes
J.Lab.Clin.Med. 82,500

150. Perez-Rojas, G., Evans, R.L., Engleman, E. (1981)
A monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with mitogenic properties
Human Immunol. 3,380

151. Perussia, B., Mangoni, L., Engers, H.D., Trinchieri, G. (1980)
Interferon production by human and murine lymphocytes in response to alloantigens
J.Immunol. 125,1589

152. Pestka, S. (1983)
The human interferons - from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, and beyond
Arch.Biochem.Biophys. 222,1

153. Peter, H.H., Dallügge, H., Zawatzky, R., Euler, S., Leibold, W., Kirchner, H. (1980)
Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and Corynebacterium parvum
Eur.J.Immunol. 10,547

154. Pharmacia Fine Chemicals (1979)
Protein A the anti-antibody reagent
Separation News 5

155. Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Mier, J.W., Woods, A.M., Gallo, R.C. (1980)
T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor
Proc.Natl.Acad.Sci USA 77,6815

156. Preble, O.T., Black, R.J., Friedman, R.M., Klippel, J.H., Vilcek, J. (1982)
Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon
Science 216,429

157. Rappaport, R.S., Dodge, G.R. (1982)
Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2
J.Exp.Med. 155,943

158. Ratliff, T.L., MacDermott, R.P., Poepping, N.J., Oakley, D.M., Shapiro, A., Catalona, W.J. (1982)
Production of gamma interferon by human T and null cells and its regulation by macrophages
Cell.Immunol. 74,111

159. Reem, G.H., Cook, L.A., Hendriksen, D.M., Vilcek, J. (1982)
Gamma interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B cell lines
Infect.Immun. 37,216

160. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Pesando, J.M., Ritz, J., Goldstein, G., Schlossman, S.F. (1979)
Ia determinants on human T cell subsets defined by monoclonal antibodies
J.Exp.Med. 150,1472

161. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F. (1980)
A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH_2
J.Immunol. 124,1301

162. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H., Schlossman, S.F. (1980)
Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage
Proc.Natl.Acad.Sci USA 77,1588

163. Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. (1980)
The differentiation and function of human T lymphocytes
Cell 19,821

164. Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H., Schlossman, S.F. (1980)
A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen
Nature 283,583

165. Robb, R.J. (1984)
Interleukin 2: the molecule and its function
Immunol.Today 5,203

166. Rosa, F., Fellous, M. (1984)
The effect of gamma-interferon on MHC antigens
Immunol.Today 5,261

167. Saksela, E., Virtanen, I., Hovi, T., Secher, D.S., Cantell, K., (1983)
Monocyte is the main producer of human alpha interferons following Sendai virus induction
Proc.Med.Virol. 30,3

168. Santos, L.B., Yamada, F.T., Scheinberg, M.A. (1985)
Monocyte and lymphocyte interaction in patients with advanced cancer. Evidence for deficient IL-1 production
Cancer, 56,1553

169. Schlossman, S.F., Reinherz, E.L. (1984)
Human T-cell subsets in health and disease
Springer Sem.Immunopathol. 7,9

170. Schober, I., Braun, R., Reiser, H., Munk, K., Leroux, M., Kirchner, H. (1984)
Ia-positive T lymphocytes are the producer cells of interferon gamma
Exp.Cell.Res. 152,348

171. Schreiber, R.D., Pace, J.L., Russell, S.W., Altman, A., Katz, D.H. (1983)
Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: physio-chemical and biosynthetic resemblance to γ-interferon
J.Immunol. 131,826

172. Scollay, R. (1985)
Control of T-cell development
Nature 314,16

173. Shows, T.B., Sakaguchi, A.Y., Naylor, S.L., Goeddel, D.V., Lawn, R.M. (1982)
Clustering of leukocyte and fibroblast interferon genes on human chromosome 9
Science 218,373

174. Smith, K.A., Lachmann, L.B., Oppenheim, J.J., Favata, M.F. (1980)
The functional relationship of the interleukins
J.Exp.Med. 151,1551

175. Solbach, W., Lange, C.E., Röllinghoff, M., Wagner, H. (1984)
Growth, interleukin-2 production, and responsiveness to IL-2 in T4-positive T lymphocyte populations from malignant cutaneous T cell lymphoma (Sezary's syndrome): the effect of cyclosporine A
Blood 64,1022

176. Spitz, M., Gearing, A., Callus, M., Spitz, L., Thorpe, R. (1985)
Interleukin-2 in vivo: production of and response to interleukin-2 in lymphoid organs undergoing a primary immune response to heterologous erythrocytes
Immunology 54,527

177. Stadler, B. (1986)
Clinical significance of measuring IL-2 (Vortrag)
IUIS/WHO Lymphokine Standardization Subcommittee, Erlangen

178. Stevenson, H.C., Dekaban, G.A., Miller, P.J., Benyajati, C., Pearson, M.L. (1985)
Analysis of human blood monocyte activation at the level of gene expression. Expression of alpha interferon genes during activation of human monocytes by poly IC/LC and muramyl dipeptide
J.Exp.Med. 161,503

179. Stewart II, W.E. (1980)
Interferon nomenclature
Nature 286,110

180. Stiem, E.R., Kronenberg, L.H., Rosenblatt, H.M., Bryson, Y., Merigan, T.C. (1982)
Interferon: Immunobiology and clinical significance
Ann.Intern.Med. 96,80

181. Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R. Kemshead, J., Greaves, M. (1981)
Ubiquitous cell surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin
Proc.Natl.Acad.Sci USA 78,4515

182. Taniguchi, T., Mantei, N., Schwarzstein, M., Nagata, S., Muramatsu, M., Weismann, C. (1980)
Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related
Nature 285,547

183. Targan, S., Dorey, F. (1980)
Interferon activation of "pre-spontaneous killer" (pre-SK) cells and alteration of kinetics of lysis of both "pre-SK" and active SK cells
J.Immunol. 124,2157

184. Tax, W.J.M., Willems, H.W., Reekers, P.P.M., Capel, P.J.A., Koene, R.A.P. (1983)
Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T 3 antigen on human T cells
Nature 304,445

185. Taylor, S., Bryson, Y. (1985)
Impaired production of γ-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage
J.Immunol. 134,1493

186. Terasaki, P.I. (1980)
Histocompatibility testing, UCLA Tissue Typing Laboratory

187. Timonen, T., Saksela, E., Virtanen, I., Cantell, K. (1980)
Natural killer cells are responsible for the interferon production induced in human lymphocytes by tumor cell contact
Eur.J.Immunol. 10.422

188. Timonen, T., Ortaldo, J.R., Stadler, B.M., Bonnard, G.D., Sharrow, S.O., Herberman, R.B. (1982)
Cultures of purified human natural killer cells: growth in the presence of interleukin 2
Cell.Immunol. 72,178

189. Todd, R.F., Nadler, L.M., Schlossman, S.F. (1981)
Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies
J.Immunol. 126,1435

190. Trent, J.M., Olson, S., Lawn, R.M. (1982)
Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization
Proc.Natl.Acad.Sci USA 79,7809

191. Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.V., Sheera, J., London, L., Perussia, B. (1984)
Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2
J.Exp.Med. 160,1147

192. Trinchieri, G., Perussia, B. (1985)
Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects
Immunol.Today 6,131

193. Trunen, A., Albert, F., Goldstein, P., Schmitt-Verhulst, A.-M., (1985)
Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester
Nature 313,318

194. Tsujisaki, M., Igarashi, M., Eisinger, M., Ferrone, S. (1985)
Characterization of the induction of class II HLA antigens by recombinant immune interferon in melanocytes
Clin.Res. 33,691A

195. Ücer, U. Bartsch, H., Scheurich, P., Pfizenmaier, K. (1985)
Biological effects of γ-interferon on human tumor cells: Quantity and affinity of cell membrane receptors for γ-IFN in relation to growth inhibition and induction of HLA-DR expression
Int.J.Cancer 36,103

196. Valentine, M.A., Tsoukas, C.D., Rhodes, G., Vaughan, J.H., Carson, D.A. (1985)
Phytohemagglutinin binds to the 20-kDa molecule of the T3 complex
Eur.J.Immunol. 15,851

197. Valle, M.J., Jordan, G.W., Haahr, S., Merigan, T.C. (1975)
Characteristics of immune interferon produced by human lymphocyte cultures compared to other human interferons
J.Immunol. 115,230

198. Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R., Goossens, J.G. (1980)
OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties
J.Immunol. 124,2708

199. Venuta, S., Mertelsmann, R., Welte, K., Feldman, S.P., Wang, C.Y., Moore, M.A.S. (1983)
Production and regulation of interleukin-2 in human lymphoblastic leukemias studied with T-cell monoclonal antibodies
Blood 61,781

200. Vervliet, G., Deckmyn, H., Carton, H., Billiau, A. (1985)
Influence of prostaglandin E_2 and indomethacin on interferon γ production by cultured peripheral blood leukocytes of multiple sclerosis patients and healthy donors
J.Clin.Immunol. 5,102

201. Vilcek, J., Pearlstein, K.T., Le, J., Stone-Wolff, D.S., Kelker, H.C., Yip, Y.K. (1983)
Interferon-gamma: interactions with other lymphokines
in: The biology of the interferon system 1983, 281, Hrsg. DeMaeyer, E., Schellekens, H., Elsevier Science Publishers B.V.

202. Von Wussow, P., Platsoucas, C.D., Wiranowska-Stewart, M., Stewart, W.E. II. (1981)
Human interferon production by leukocytes induced with monoclonal antibodies recognizing T cells
J.Immunol. 127,1197

203. Von Wussow, P., Chen. Y.-S., Wiranowska-Stewart, M., Stewart, W.E. II. (1982)
Induction of human γ-interferon in lymphoid cells by staphylococcus enterotoxin B; partial purification
J.Interferon Res. 2,11

204. Vyth-Dreese, F.A., van der Reijden, H.J., de Vries, J.E. (1982)
Phorbol-ester-mediated induction and augmentation of mitogenesis and interleukin-2 production in human T-cell lymphoproliferative disease
Blood 60,1437

205. Wagner, H., Röllinghoff, M., Pfitzenmaier, K. (1982)
The influence of the thymus on the generation of T cell repertoire
Behring Inst.Mitt. 70

206. Wakasugi, N., Virelizier, J.-L. (1985)
Defective interferon IFN-γ production in the human neonate. I. Dysregulation rather than intrinsic abnormality
J.Immunol. 143,167

207. Wakasugi, N., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Rothhut, B., Mencia Huerta, J.-M., Russo-Marie, F., Fiers, W. (1985)
Defective IFN-γ production in the human neonate. II. Role of increased sensitivity to the suppressive effects of prostaglandin E
J.Immunol. 134,172

208. Weiel, J.E., Adams, D.O., Hamilton, T.A. (1985)
Biochemical models of γ-interferon action: altered expression of transferrin receptors on murine peritoneal macrophages after treatment in vitro with PMA or A 23187
J.Immunol. 134,293

209. Weil, J., Epstein, C.J., Epstein, L.B., Sedmak, J.J., Sabran, J.L., Grossberg, S.E. (1983)
A unique set of polypeptides is induced by γ interferon in addition to those induced in common with α and β interferons
Nature (London) 301,437

210. Weiss, A., Wiskocil, R.L., Stobo, J.D. (1984)
The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occuring at a pre-translational level
J.Immunol. 133,123

211. Wheelock, E.F. (1965)
Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin
Science 149,310

212. Wilkinson, M., Morris, A. (1983)
Interferon with novel characteristics produced by human mononuclear leukocytes
Biochem.Biophys.Res.Commun. 11,498

213. Wilkinson, M., Morris, A. (1983)
Partial purification and some biological properties of interferon with novel characteristics produced by human mononuclear leukocytes
in: The biology of the interferon system 1983, 149, Hrsg. DeMaeyer, E., Schellekens, H., Elsevier Science Publishers B.V.

214. Wiskocil, R.L., Weiss, A., Imboden, J., Kamin-Lewis, R., Stobo, J. (1985)
Activation of a human T cell line: a two-stimulus requirement in the pretranslational events involved in the coordinate expression of interleukin 2 and γ-interferon genes
J.Immunol. 134,1599

215. Wolos, J.A., Davey, F.R. (1980)
T-Lymphocyte function in B-cell chronic lymphocytic leukemia
Clin.Immunol.Immunopathol. 17,573

216. Yamaguchi, T., Handa, K., Shimizu, Y., Abo, T., Kumagai, K. (1977)
Target cells for interferon production in human leukocytes stimulated by sendai virus
J.Immunol. 118,1931

217. Yip, Y.K., Pang, R.H.O., Oppenheim, J.D., Nachbar, M.S., Hendriksen, D., Zerebecky-Eckhard, J., Vilcek, J. (1981)
Stimulation of human gamma interferon production by diterpene esters
Infect.Immun. 34,131

218. Yip, Y.K., Barrowclough, B.S., Urban, C., Vilcek, J. (1982)
Molecular weight of human gamma interferon is similar to that of other human interferons
Science 215,411

219. Yip, Y.K., Kelker, H.C., Stone-Wolff, D.S., Pearlstein, K., Urban, C., Vilcek, J. (1983)
Stimulation of lymphokine production by teleocidine, aplysiatoxin and debromaplysiatoxin
Cell.Immunol. 79,389

220. Zamkoff, K.W., Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Moore, J.L., Davey, F.R., Planas, A.T., Lamberson, H. (1984)
Functional diversity within the suppressor phenotype as defined by monoclonal antibody in T-cell prolymphocytic leukemia
Am.J.Hematol. 16,409

221. Zawatzky, R., Kirchner, H., DeMaeyer-Guignard, J., DeMaeyer, E. (1982)
An x-linked locus influences the amount of circulating interferon by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) induced in the mouse
J.Gen.Virol. 63,325

222. Zoumbos, N.C., Djeu, J.Y., Young, N.S. (1984)
Interferon as the suppressor of hematopoiesis generated by stimulated lymphocytes in vitro
J.Immunol. 133,769

L e b e n s l a u f

26. Februar 1957	geboren in Hamburg als Tochter des Rechtsanwalts Dr. Günther Doldi und seiner Frau Helga, geb. Schärfe.
1963 - 1967	Besuch der Grundschule in Braunschweig
1967 - 1968	Besuch des Johanna-Sebus-Gymnasiums in Kleve am Niederrhein
1968 - 1975	Besuch des neusprachlichen Zweigs des Ricarda-Huch-Gymnasiums in Krefeld und Ablegung der Reifeprüfung
1975 - 1977	Aufnahme des Studiums für das Lehramt Sek. II in Biologie und Spanisch an der Ruhr-Universität Bochum und Ablegung der Zwischenprüfung
1977 - 1979	Weiterführung des Studiums an der TH Aachen
SS 1979	Studienfachwechsel zur Diplombiologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
März 1980	Vordiplom im Fach Biologie
März 1981	Diplomprüfung im Fach Biologie
April 1981 bis Mai 1982	Diplomarbeit am Institut für klinische Immunologie und Rheumatologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J.R. Kalden
November 1982	Beginn der Dissertation bei Herrn. Prof. Dr. J.R. Kalden.
September 1986	Eheschließung

COPY PRINT
Klaus Feller
Marquardsenstr. 21
8520 Erlangen
Tel.: 0 91 31 / 24 220